

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Химический факультет
Кафедра аналитической химии

На правах рукописи



ШЕВЛЯКОВА ОЛЕСЯ АЛЕКСАНДРОВНА

Определение флавоноидов горянки и их метаболитов методом
тандемной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н., с.н.с., Родин И.А.

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1 Обзор литературы.....	12
1.1 Состав смеси флавоноидов горянки.....	12
1.2 Методы извлечения флавоноидов из горянки.....	14
1.3 Выделение отдельных биоактивных компонентов горянки.....	16
1.4 Методы определения целевых аналитов.....	19
1.4.1 Тонкослойная хроматография	19
1.4.2 Капиллярный электрофорез	20
1.4.3 Газовая хроматография.....	25
1.4.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография	26
1.5 Определение флавоноидов горянки в биопробах	32
1.6 Исследования метаболизма флавоноидов горянки	34
Глава 2 Материалы и методы исследования	44
2.1 Реактивы и материалы	44
2.2 Стандартные образцы	45
2.3 Исследуемые образцы.....	45
2.4 Оборудование, вспомогательные устройства, средства измерений и программное обеспечение	46
2.6 Приготовление рабочих и буферных растворов	48
2.6.1 Подготовка посуды	48
2.6.2 Подготовка деионизованной воды	49
2.6.3 Приготовление фосфатного буферного раствора.....	49
2.6.4 Приготовление карбонатного буферного раствора.....	49
2.6.5 Приготовление растворов стандартных образцов	49
2.6.6 Приготовление градуировочных растворов икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А и эпимедина В в метиловом спирте	50
2.6.7 Приготовление подвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	50

2.7 Техника эксперимента	51
2.7.1 Схема эксперимента по исследованию процессов масс-фрагментации и оптимизации энергии соударений	51
2.7.2 Схема эксперимента по определению флавоноидов горянки в растительных материалах и продуктах на их основе	53
2.7.3 Схема эксперимента по разработке способа извлечения основных компонентов горянки из растительных материалов сверхкритическим диоксидом углерода	55
2.7.4 Схема эксперимента по разработке способа определения действующих соединений горянки в биологических пробах	56
2.7.5 Схема эксперимента по разработке способа обнаружения флавоноидов горянки в растительном сырье и продуктах на его основе	57
2.7.6 Получение биоматериала	58
Глава 3. Результаты и обсуждение	60
3.1 Разработка способа определения флавоноидов горянки методом ВЭЖХ-МС/МС	60
3.1.1 Разработка способа идентификации икариина	60
3.1.2 Разработка способа количественного определения флавоноидов горянки в режиме регистрации выбранных ионных переходов	66
3.2 Разработка способа группового обнаружения флавоноидов горянки	77
3.3 Разработка способа экстракции флавоноидов из горянки	86
3.4 Разработка способа определения флавоноидов горянки в моче	89
3.5 Обнаружение метаболитов флавоноидов горянки в моче крыс	100
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	108
ПРИЛОЖЕНИЕ А.	133
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.	143

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

CID (ДАС)	– collision induced dissociation (диссоциация, активированная соударениями)
SRM (МВР)	– selected reaction monitoring (мониторинг заданных (выбранных) реакций)
HCD (ДАСПЭ)	– higher-energy C-trap dissociation (диссоциация, активированная соударениями при повышенной энергии)
АС	– аттестованная смесь
БАВ	– биологически активные вещества
БСТФА	– бис(триметилсилил)-N,O-трифторацетамид
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭТСХ	– высокоэффективная тонкослойная хроматография
ГР	– градуировочный раствор
ГХ	– газовая хроматография
ДМД	– диодно-матричный детектор
ЖЖЭ	– жидкостно-жидкостная экстракция
ИК	– инфракрасная спектроскопия
ИЭР	– ионизация электрораспылением
КЗЭ	– капиллярный зонный электрофорез
КЭ	– капиллярный электрофорез
КЭХ	– капиллярная электрохроматография
м.д.	– миллионные доли
МС	– масс-спектрометрия
МС/МС	– тандемная масс-спектрометрия
МСТФА	– N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид
СК-СО ₂	– экстракция сверхкритическим диоксидом углерода
СО	– стандартный образец
ТМС	– триметилсилильный
ТСХ	– тонкослойная хроматография
ТФЭ	– сорбционное концентрирование

УЗВ	– ультразвуковая ванна
УФ	– ультрафиолетовый детектор (ультрафиолетовое детектирование)
ХИАД	– химическая ионизация при атмосферном давлении
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Наиболее древнее и актуальное направление фармацевтической химии связано с созданием лекарственных средств и биологически активных добавок к пище на основе растительного сырья, в состав которого входят сотни или даже тысячи различных соединений. Терапевтический эффект, как правило, обусловлен синергизмом нескольких компонентов.

Исследование качественного и количественного состава компонентов растительного сырья и препаратов на его основе проводится как при поиске новых биологически активных соединений и реализуемых с их помощью фармакологических эффектов, так и при контроле качества сырья и готовых лекарственных форм известных препаратов. Государственной Фармакопеей РФ регулируется лишь групповое определение флавоноидов методами титриметрии и спектрофотометрии, в то время как ввиду различающихся биологических эффектов разных представителей этого ряда необходима их индивидуальная идентификация в растительном сырье. Согласно федеральному закону №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» при регистрации новых препаратов необходимо проводить исследование метаболизма и фармакокинетики активных фармакологических ингредиентов.

Открытие новых фармакологических эффектов флавоноидов инициировало более пристальное внимание исследователей к растениям рода *Epimedium*, широко используемым в рамках традиционной медицины в Китае, Корее и на Дальнем Востоке. В последние годы опубликовано большое количество работ, посвященных исследованию состава флавоноидов, характерных для некоторых представителей этого рода. При этом состав флавоноидов горянки исчерпывающим образом изучен не был. Основными действующими веществами горянки являются флавоноиды: икариин, икаритин, икаризиды I, II, эпимедины А, В, С, обладающие

широким спектром биологической активности: противоопухолевой, андрогенной, антидепрессантной, антиостеопорозной и иммуномодулирующей [1-3]. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с tandemным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения обеспечивает надежную идентификацию не только действующих веществ горянки, но и их метаболитов, благодаря высокоселективному разделению исследуемых смесей и информативным спектрам. Ограниченность доступной из литературы информации о составе флавоноидов растений рода *Epimedium* и их масс-спектрометрических характеристиках не позволяла установить общие закономерности их фрагментации. Таким образом, возникла необходимость углубленного хроматомасс-спектрометрического исследования комплекса биоактивных соединений горянки. Значительная вариабельность состава экстрактивных компонентов в различных образцах растительного сырья обуславливает необходимость разработки селективного, чувствительного и экспрессного способа определения активных компонентов горянки в растительном сырье и их метаболитов в биологических образцах.

Цели и задачи исследования.

Цель работы состояла в разработке способа определения биологически активных веществ растений рода *Epimedium* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией высокого разрешения и апробация разработанного подхода при обнаружении метаболитов флавоноидов горянки с использованием полученной из экспериментальных данных информации о путях фрагментации исследуемой группы веществ.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

– изучение процессов ионизации и путей фрагментации исследуемой группы веществ в условиях ВЭЖХ в сочетании с tandemной масс-

спектрометрией высокого разрешения, оптимизация условий получения масс-спектров;

– обоснование режима экстрагирования флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода;

– выбор условий хроматографического разделения исследуемой группы веществ;

– разработка алгоритма обнаружения флавоноидов горянки на основе закономерностей фрагментации;

– выбор условий подготовки биологических проб, обеспечивающих эффективное извлечение определяемых соединений, изучение влияния матрицы на степень ионизации;

– обнаружение метаболитов биологически активных веществ горянки в моче лабораторных животных.

Научная новизна.

1. Изучены процессы формирования масс-спектров биологически активных компонентов горянки. Установлены закономерности, связывающие структуру икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В (последовательность углеводных заместителей) со значениями m/z в спектрах в условиях ионизации электрораспылением (ИЭР). Обнаружены характеристичные сигналы в масс-спектрах (m/z 369,1333 и 313,0707), позволяющие относить неизвестные флавоноиды горянки к данному классу соединений.

2. Разработан способ извлечения флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода, обеспечивающий более эффективное извлечение (в 2,5 раза) определяемых соединений из растительных материалов и продуктов на их основе по сравнению с жидкостной экстракцией этанолом под действием ультразвука.

3. Разработан селективный способ определения икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В, С в растительном сырье и продуктах на его основе с использованием масс-спектрометрического (МС)

детектирования в режиме регистрации выбранных ионных переходов, характеризующийся низкими пределами обнаружения и высокой селективностью. Продемонстрирована возможность применения этого способа для контроля качества продуктов на основе горянки.

4. Выбраны условия подготовки проб мочи, обеспечивающие максимальную степень извлечения аналитов (93-98%) и позволяющие минимизировать влияние матрицы (матричный фактор составляет 0,94-0,98), на аналитический сигнал при сорбционном концентрировании на картриджах, заполненных модифицированным полимером стирола.

5. Предложены способ детектирования флавоноидов горянки и алгоритм, позволяющие проводить обнаружение структурных фрагментов флавоноидов горянки на основании закономерностей фрагментации, заключающийся в получении тандемных масс-спектров в режиме зависящего сканирования ионов-продуктов с предварительно установленными значениями нейтральных потерь (m/z 132,0423, 146,0579 и 162,0528).

6. Применение разработанного подхода позволило обнаружить шесть метаболитов, ранее не описанных в литературе, в моче крыс и предположить их возможные структуры, соответствующие полученным результатам с использованием программ ACDLabs/ biotransformation maps, ACDLabs/Percepta, MetWork.

Практическая значимость. Разработанный способ апробирован при контроле качества растительного сырья и продуктов на его основе. Показано, что использование метода ВЭЖХ-МС/МС позволяет проводить надежное обнаружение и оценивать содержание икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов A, B, C – основных действующих компонентов различных видов горянки, что может быть использовано для выявления фактов фальсификации растительного сырья и лекарственных средств на его основе.

На основании полученных результатов разработана, аттестована и внесена в реестр аттестованных методик измерения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии «Росстандарт» методика

измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии (№6.00163/2-28-2016 от 28.03.16).

На защиту выносятся следующие положения:

1. Исследование закономерностей формирования масс-спектров флавоноидов горянки в условиях электрораспылительной ионизации показывает, что в масс-спектрах данных аналитов присутствуют характеристичные сигналы, позволяющие проводить групповое обнаружение соединений, относящихся к данному классу.

2. Использование экстрагирования флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода увеличивает степень извлечения в 2,5 раза по сравнению с жидкостной экстракцией.

3. Разработанная методика измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C в растительных продуктах на основе горянки методом ВЭЖХ-МС/МС позволяет снизить пределы обнаружения и повысить селективность определения аналитов.

4. Разработанный способ подготовки проб мочи обеспечивает высокую степень извлечения аналитов и позволяет минимизировать влияние матрицы на ионизацию определяемых соединений.

5. Разработанный алгоритм обнаружения флавоноидов горянки на основании закономерностей формирования масс-спектров стандартных образцов веществ известной структуры позволяет выявлять ранее неизвестные метаболиты и делать предположения о возможных структурах обнаруженных соединений.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на II Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации», посвящённой 85-летию со дня

рождения В.А. Кухтина (г. Чебоксары, 2014 г.), Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященной памяти проф. М.С. Вигдергауза (г. Самара, 2015 г.), VI Российско-корейской конференции «Современные достижения химии биологически активных веществ и биотехнологии» (г. Новосибирск, 2015 г.), IX Всероссийской научной конференции с международным участием и школе молодых учёных «Химия и технология растительных веществ» (г. Москва, 2015 г.), I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина» (г. Москва, 2015 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 5 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, двух глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 132 страницах машинописного текста (без учета приложения), содержит 29 рисунков и 21 таблицу, в списке цитируемой литературы 214 источников. Приложение включает 7 рисунков, 1 таблицу и 1 методику на 47 страницах.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Состав смеси флавоноидов горянки

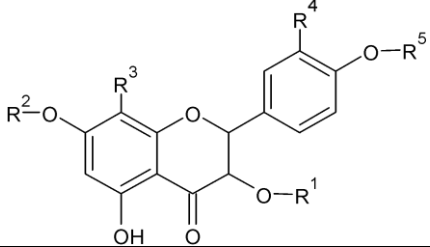
Горянка (лат. *Epimedium*) — род многолетних травянистых растений семейства Барбарисовые, включает в себя более 60 видов. Встречается исключительно в Восточном полушарии, где заселяет предгорья Европы, Кавказа, Турции, Японии и Китая. В Северо-Западной Африке найден лишь один вид. В природе горянка произрастает во влажных горных лесах или на горных отрогах [4, 5].

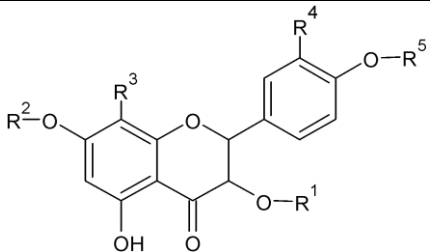
В настоящее время у растений рода *Epimedium* обнаружены следующие свойства: нормализуют мочеиспускание, устраняют головокружение, приводят в норму обмен жидкости в организме, омолаживают организм, устраняют усталость, снимают стресс [6-15]. При этом в течение длительного времени в медицине используются лишь немногие виды горянки. Согласно китайской фармакопее [16], высушенные надземные части *Epimedium brevicornu Maxim.*, *Epimedium sagittatum Maxim.*, *Epimedium pubescens Maxim.*, *Epimedium wushanense T.S. Ying* и *Epimedium koreanum Nakai* содержат наиболее высокие концентрации флавоноидов, которые являются важнейшими функционально значимыми соединениями, присутствующими в этих растениях, и обладают биологической активностью: антиопухолевой, андрогенной, антидепрессантной, антиостеопорозной и иммуномодулирующей [17-29]. Основные действующие компоненты горянки представляют собой пренилированные дигликозиды кемпферола, отличающиеся молекулами сахаров. В табл. 1 представлены структуры самых распространённых флавоноидов растений рода *Epimedium*.

Горянку широко используют в фитомедицине, поэтому для разработки методик идентификации, количественной оценки содержаний и контроля качества растительного сырья, экстрактов и коммерческих продуктов выполнено значительное число работ. Наиболее популярными методами определения действующих компонентов горянки стали ВЭЖХ и

капиллярный электрофорез. Газовую хроматографию (ГХ) для исследования флавоноидов применяют реже жидкостной, так как данные вещества имеют значительную массу, малую термическую стабильность и не обладают летучестью, в связи, с чем требуется дериватизация, увеличивающая продолжительность анализа [30].

Таблица 1 – Структурные формулы основных флавоноидов горянки

№ п/п	Соединение					
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
1	Ангидроикаритин	H	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
2	Ангидроикаритин-3,7-ди-О-глюкозид	glu	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
3	Баохуозид I	rha	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
4	Баохуозид II	rha	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	H
5	Баохуозид VII	rha(4-1)glu	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
6	Гександразид E	glu	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	H
7	Гександразид F	rha(3-1)glu	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
8	Икаризид I	H	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
9	Икаризид II	rha	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
10	Икариин	rha	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
11	Икаризоид C	rha(2-1)glu	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	H
12	Иперин	gal	H	H	OH	OH
13	Кемпферол-3-О-рамнозид	rha	H	H	H	H
14	Каохуозид A	rha(1-4)(OAc)- (1-3)glu(1-4)(OAc) (1-6)(OAc)	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
15	Каохуозид B	rha(1-4)(OAc)- (1-3)glu(1-4)(OAc) (1-6)(OAc)	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
16	Каохуозид C	rha	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	OH	CH ₃
17	Корепимедозид A	rha(1-4)(OAc)- (1-3)glu(1-4)(OAc)	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
18	Корепимедозид C	rha(1-4)(OAc)- (1-3)glu	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
19	2'-О-рамнозил икаризид II	rha	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃

№ п/п	Соединение					
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
20	Сагиттатозид А	rha(2-1)glu	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
21	Сагиттатозид В	rha(2-1)xyl	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
22	Эпимедин А	rha-(1-2)glu	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
23	Эпимедин В	rha-(1-2)xyl	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
24	Эпимедин С	rha-(1-2)rha	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃
25	Эпимедозид А	rha	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	H
26	Эпимедозид С	H	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	H
27	Эпимедокореанозид I	rha(1-4)(OAc)- (1-3)glu(1-4)(OAc)	glu	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	H	CH ₃

Примечание: Ac = ацетил, glu = глюкозил, rha = рамнозил, xyl = ксилозил.

Изучая механизмы биологической активности растений и развивая методы их определения, исследователи сталкиваются с проблемой труднодоступности СО этих веществ [31]. Поэтому дальнейшее изучение влияния флавоноидов на живые организмы напрямую зависит от развития методов выделения, разделения, идентификации и количественного определения действующих компонентов в горянке.

1.2 Методы извлечения флавоноидов из горянки

Этап подготовки проб является одним из важных этапов в развитии аналитических методов для анализа лекарственных растений [32-34]. Оптимальный метод экстракции позволяет более полно исследовать состав основных компонентов горянки.

В качестве экстрагента для извлечения флавоноидов из горянки используют воду [35], смеси метанол-вода [36], этанол-вода [37-49]. Более предпочтительным является экстрагирование 70%-ым этанолом [37-39, 41, 43, 45, 48]. Применяют трудоёмкие способы, требующие достаточно высоких температур: кипячение и экстрагирование в аппарате Сокслета. Так,

предложен метод экстрагирования пяти гликозидов флавоноидов горянки (икариин, эпимедин А, В, С и иперин) из высушенных листьев при нагревании (80 °С) с 70%-ным этанолом с обратным холодильником в течение 3 ч [38]. После охлаждения образец отфильтровывали и супернатант лиофилизировали. В работе [40] измельчённые листья экстрагировали 50%-ным этанолом с обратным холодильником в течение 1 ч при 100 °С, фильтрат выпаривали досуха при пониженном давлении. Чэнь и др. [50] экстрагировали флавоноиды 50%-ным этанолом в течение 30 мин при 90 °С, фильтровали через 0,45 мкм микропористые мембраны, фильтрат собирали, а твёрдые вещества экстрагировали ещё 3 раза небольшим объёмом 50%-ного раствора этанола. Флавоноиды извлекали и в аппарате Сокслета: измельчённое растение смешивали с 50%-ным этанолом и выдерживали в аппарате при 90 ± 2 °С в течение 90 и 240 мин [51]. Наилучшее извлечение достигнуто при экстрагировании в течение 240 мин.

Ультразвуковое оборудование широко используют в аналитической химии, в частности, при экстрагировании. Достоинствами его применения являются: уменьшение времени экстракции, снижение температуры и повышение полноты извлечения. Экстракцию проводят в ультразвуковом поле при 25 °С в течение часа [47], либо в течение 30 мин [41]. Показано, что извлечение эпимедина А, В, С и икариина 50%-ным этанолом в течение 30 мин при 50 °С с использованием ультразвуковой техники эффективнее экстрагирования в аппарате Сокслета [48].

Предложен быстрый метод для одновременного определения семи флавоноидов в горянке [47]. Подготовку проб проводили с использованием жидкостной экстракции под давлением. В качестве растворителя использовали 70%-ный этанол, размер частиц составлял 0,3 – 0,4 мм, температура 120 °С, давление 10 МПа, время экстрагирования 10 мин. Затем экстракт пропускали через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм. Такую же методику экстрагирования использовали для одновременного определения 15 флавоноидов [39, 52].

Экстракция в микроволновом поле является хорошей альтернативой методу Сокслета и обработке ультразвуком. Она обеспечивает равномерность прогревания образца [53], что позволяет значительно сократить энергозатраты, исключить потери тепла [54, 55]. Микроволновая экстракция икаризида I в течение 10 мин оказалась более эффективной по сравнению с традиционными методами извлечения [56]. Эксперименты показали, что выходы продукта экстракции возрастают с увеличением мощности. Оптимальными условиями микроволнового извлечения являются мощность 600 Вт, температура 70 °С и продолжительность 10 мин. С использованием микроволновой экстракции разработан метод определения эпимедина А, В, С, икариина и икаризида I с помощью ВЭЖХ в сочетании с диодно-матричным детектором и тандемным масс-спектрометром [56].

1.3 Выделение отдельных биоактивных компонентов горянки

Компоненты горянки и их функции изучают с помощью выделения по принципу биоактивности [57]. Для доказательства биоактивности вещества готовят «нокаут» экстракт, из которого данный компонент удалён [58]. Если биоактивность полученного экстракта меньше, то устранённый компонент является физиологически активным. Такой подход используют в генной инженерии и фармакологических исследованиях с 1989 г. [59]. Для приготовления «нокаут» экстракта используют различные варианты хроматографии.

В последнее время для выделения монокомпонентов применяют высокоскоростную противоточную хроматографию [60-75]. Так, предложен способ извлечения биоактивных компонентов (эпимедина А, В, С и икариина) с использованием высокоскоростной противоточной хроматографии и препаративной ВЭЖХ для оценки антиостеопорозной активности [43]. Для этого порошок травы горянки (*Herba Epimedium*) экстрагировали 3 раза 70%-ным этанолом. Экстракт сушили под вакуумом в роторном испарителе. Высушенный порошок растворяли в подвижной фазе.

Высокоскоростную противоточную хроматографию проводили с применением смесей *n*-гексан: *n*-бутанол: метанол: вода (1: 5: 1,5: 6,5 по объёму). Препаративное выделение осуществляли на колонке PRC-ODS длиной 250 мм, внутренним диаметром 20 мм, с размером зерна сорбента 5 мкм (фирмы «Shimadzu»). В качестве подвижной фазы использовали 0,05%-ный водный раствор фосфорной кислоты и ацетонитрил. Детектировали действующие вещества при 270 нм.

Описан метод выделения икариина из этанольного экстракта *Epimedium segittatum* с помощью высокоскоростной противоточной хроматографии [46]. Высушенные листья *Epimedium segittatum* экстрагировали 95%-ным этанолом 3 раза. Экстракты объединяли и сушили под вакуумом. Гидрофобные компоненты удаляли последовательным извлечением *n*-гексаном, дихлорметаном и этилацетатом. Затем остаток 3 раза экстрагировали *n*-бутанолом. Экстракт упаривали под вакуумом и сушили вымораживанием. В высокоскоростной противоточной хроматографии использовали систему растворителей, состоящую из смеси *n*-гексан: *n*-бутанол: метанол: вода (1: 4: 2: 6 по объёму). Авторам удалось выделить икариин с чистотой 85,7% и 86,2%, которую проверяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при 254 нм. Икариин с чистотой более 98% получали после перекристаллизации из воды.

В отличие от работы [46] Ренмин Лиу и др. [45] предложили способ выделения икариина с чистотой 99,7% в одну стадию разделения. Авторам также удалось выделить эпимедокореанозид I (98,2%) и икаризид II (98,5%). Подготовка сырого экстракта заключалась в измельчении сухих листьев *Epimedium koreanum*. Полученный порошок экстрагировали 70%-ным этанолом в течение 2 ч с обратным холодильником. Экстракцию повторяли дважды. Объединённый экстракт концентрировали под вакуумом. Более эффективен метод препаративного разделения с использованием высокоскоростной противоточной хроматографии проводили с применением смеси хлороформ: метанол: вода (4: 3,5: 2 по объёму). Данная система

растворителей оказалась оптимальной. При использовании смеси этилацетат: вода (5: 5 по объёму) чистота икаризида II составила только 68,2%. Система растворителей этилацетат: метанол: вода (5: 1: 5 и 5: 3: 5 по объёму) позволила получить икариин с чистотой 98%, а икаризид II и эпимедокореанозид I ниже, чем 80%. При применении смесей хлороформ: метанол: вода (4: 2,5: 2 и 4: 3: 2 по объёму) значительно увеличилось время разделения. При изменении соотношения растворителей на 4: 3: 2, наблюдалось уширение пика икаризида II, а соотношение 4: 4: 2 привело к уменьшению чистоты выделяемых флавоноидов. Также исследовано влияние скорости вращения, скорости потока подвижной фазы и температуры на разделение изучаемых компонентов. Оптимальные результаты наблюдались при потоке 2.0 мл/мин, частоте вращения 900 об/мин и температуре 25 °С. Чистоту выделенных флавоноидов проверяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при 254 нм, а структуру подтверждали ¹H и ¹³C ЯМР спектрами.

Авторам работы [76] удалось выделить четыре индивидуальных биоактивных флавоноида с использованием двухрежимной противоточной хроматографии с системой растворителей, состоящей из *n*-бутанола: этилацетата: воды (3: 7: 10 по объёму). Экстракцию из высушенных надземных частей *Epimedium brevicornum Maxim.* проводили этилацетатом и этанолом при обработке ультразвуком. Чистота активных компонентов составляла 98,2% для эпимедина А, 92,6% для эпимедина В, 90,4% для эпимедина С и 96,8% для икариина.

Представленные способы выделения флавоноидов горянки позволяют получать их в достаточных количествах, тем самым способствуя изучению биологической активности данных компонентов и контролю качества фитопрепаратов.

1.4 Методы определения целевых аналитов

1.4.1 Тонкослойная хроматография

Тонкослойная хроматография (ТСХ) занимает одно из ведущих мест в качественном и полуколичественном анализе сложных природных, фармацевтических, медикобиологических и химических объектов [77, 78]. Основными преимуществами ТСХ являются ее быстрота, стабильность, гибкость и низкая стоимость анализа [79, 80]. В фармацевтической промышленности ТСХ применяют для быстрого качественного анализа или идентификации различных объектов [81]. Несмотря на все преимущества ТСХ данный метод для определения флавоноидов горянки применяют сравнительно редко.

Авторы работы [42] сравнили ВЭЖХ и высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) с денситометрическим детектированием икариина из пяти различных образцов сухого экстракта *Epimedium koreanum* и не обнаружили в полученных двумя методами результатах никаких статистически значимых различий. ВЭЖХ проводили при комнатной температуре в течение 40 мин. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил и 0,03%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты. Детектировали при 270 нм.

ВЭТСХ проводили на стеклянных пластинах Kieselgel 60 F 254 (10 × 10 см) с использованием в качестве подвижной фазы смеси из этилацетата: ледяной уксусной кислоты: муравьиной кислоты: воды (10: 1: 1: 2 по объёму). Время элюирования составляло 20 мин. Для визуализации разделённых веществ использовали УФ-облучение при 270 нм. Показано, что предложенный метод можно применять для определения икариина в экстрактах горянки.

1.4.2 Капиллярный электрофорез

Капиллярный электрофорез (КЭ) на сегодняшний день является одним из наиболее перспективных и высокоэффективных методов разделения, анализа сложных смесей и находит всё более широкое применение, в том числе для исследования лекарственных растений [82-93]. Данный метод характеризуется экономичностью, благодаря экспрессности анализа, высокой эффективностью разделения и небольшим расходом реагентов [94, 95].

КЭ применяют и для анализа флавоноидов горянки. Предложен метод КЭ-УФ для одновременного определения икариина, икаризида II и эпимедина А [49]. Сухие листья экстрагировали этанолом: водой (70: 30) под действием ультразвука, после чего пропускали через колонку НР 20 (500 × 20 мм), применяя в качестве элюента 60%-ный этанол. Оптимальные условия КЭ были получены при использовании 8 мМ бората натрия в ацетонитриле-воде (60: 40 по объёму) (рН 11,4), напряжении + 20 кВ и детектировании при 270 нм. Минимальные определяемые содержания для трех флавоноидов колебались от 0,24 до 0,84 мг/кг (отношение сигнал/ шум ≥ 3).

Пики идентифицировали тремя способами: сравнением времен миграции пиков неизвестных компонентов со временами миграции стандартных образцов, полученными в тех же условиях, сравнением УФ спектров со спектрами стандартных образцов икариина, икаризида II и эпимедина А, полученными в тех же условиях, использованием метода добавок.

Данные, полученные методом КЭ-УФ, подтверждали ВЭЖХ-УФ [96]. Оба метода дали сопоставимые результаты (табл. 2).

Таблица 2 – Содержание флавоноидов в листьях различных видов горянки, полученные методами КЭ-УФ и ВЭЖХ-УФ (мкг/кг) [49]

№ п/п	Образец	Икариин		Икаризид II		Эпимедин А	
		КЭ	ВЭЖХ	КЭ	ВЭЖХ	КЭ	ВЭЖХ
1	<i>E. sagittatum Maxim.</i>	20,4	20,8	4,2	4,5	10,4	10,8
2	<i>E. pubescens Maxim.</i>	32,5	31,0	9,0	8,7	18,4	17,6

№ п/п	Образец	Икариин		Икаризид II		Эпимедин А	
		КЭ	ВЭЖХ	КЭ	ВЭЖХ	КЭ	ВЭЖХ
3	<i>E. wushanense T. S. Ying</i>	54,2	52,7	12,0	11,2	36,2	35,7
4	<i>E. acuminatum</i>	16,3	16,9	4,2	4,4	12,1	11,6
5	<i>E. koreanum Nakai</i>	74,1	72,8	20,3	19,6	55,6	57,1
6	<i>E. leptorrhizum Stearn</i>	67,5	66,2	16,2	16,6	46,8	46,0
7	<i>E. membranaceus Franch</i>	45,3	44,1	11,4	10,7	29,2	28,5
8	<i>E. fargesii Franch</i>	55,4	52,9	16,2	16,1	40,0	39,2
9	<i>E. davidii Franch</i>	28,1	26,4	6,3	6,0	16,3	16,2
10	<i>E. sutchanense Franch</i>	42,7	43,2	13,1	12,5	31,2	30,9

Из табл. 2 следует, что содержание флавоноидов зависит от вида горянки. Это означает, что растения разных видов сильно отличаются по качественному составу и по фармакологическому эффекту.

Авторы работы [97] оптимизировали метод [98] для количественного определения флавоноидов в горянке с использованием капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с диодно-матричным детектированием для контроля качества растительного сырья и медицинских препаратов на его основе. Лучшее разделение действующих компонентов достигнуто при использовании 50 мМ боратного буферного раствора (рН 10,0), содержащего 22% ацетонитрила в качестве модификатора, напряжении 15 кВ и температуре 25 °С (рис. 1).

В табл. 3 приведены полученные результаты. Стоит отметить, что в качестве внутреннего стандарта использовали рутин.

Данные результаты согласуются с результатами работы [98].

В последнее время широкое внимание привлекла капиллярная электрохроматография (КЭХ) [99-108]. Это гибридный метод, сочетающий принципы КЭ и ВЭЖХ. В КЭХ движение подвижной фазы через колонку создаётся за счёт приложенного вблизи концов капилляра электрического поля вследствие электроосмоса, а разделение аналитов происходит как вследствие различия в их электрофоретической подвижности, так и вследствие их различного взаимодействия с неподвижной фазой.

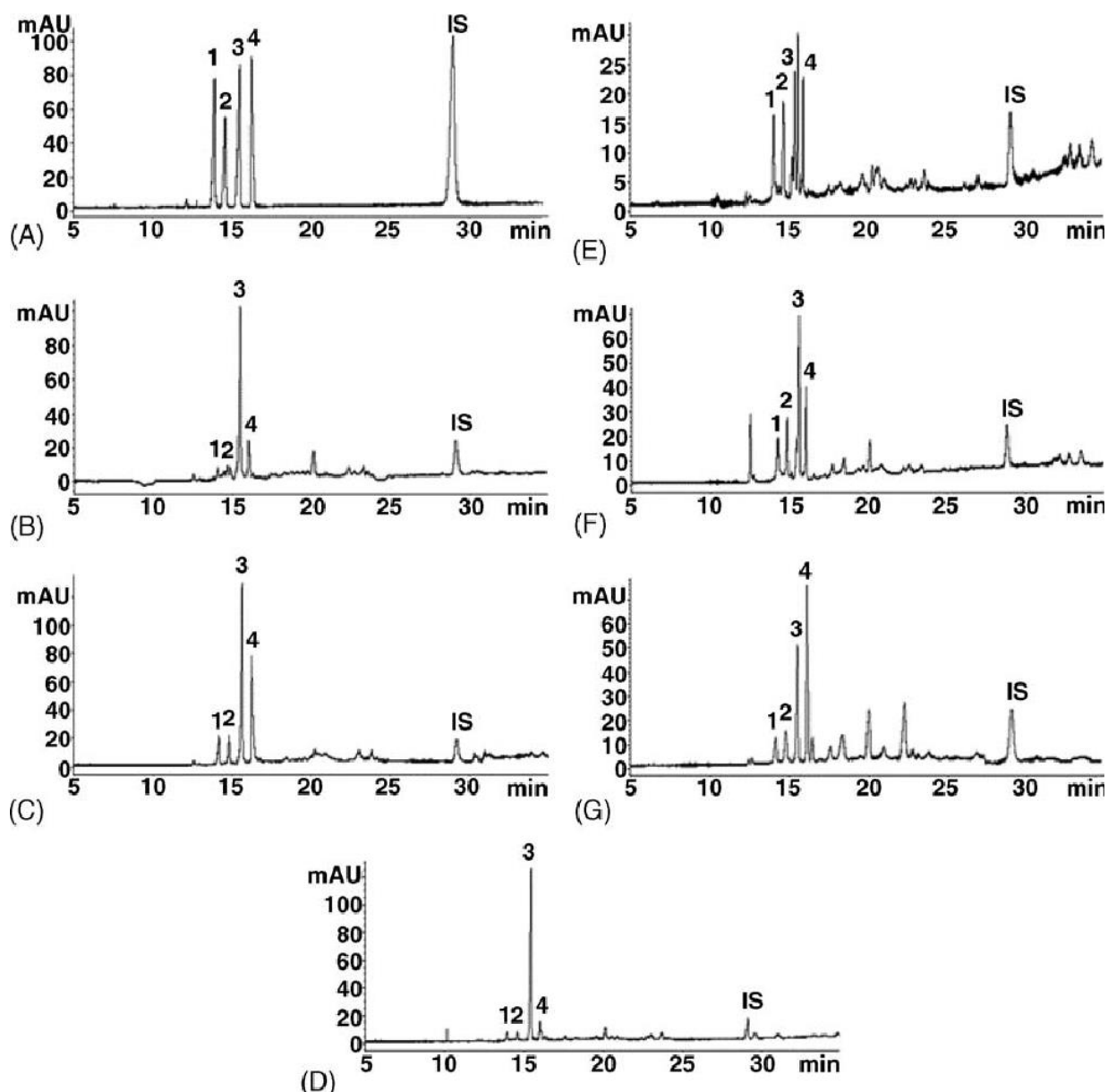


Рис. 1. Электроферограмма, полученная методом КЗЭ с 50 мМ боратным буфером (рН 10.0) с 22 % ацетонитрила, капилляром 56 см × 75 мкм, с напряжением 15 кВ, температурой 25 °С, с инъекцией образца под давлением 50 мбар × 5с, с детектированием при длине волны 270 нм: (А) стандартного образца из 4 флавоноидов, (В-Д) *Epimedium sagittatum*, (Е) *Epimedium pubescens*, (F) *Epimedium wushanense* и (G) общий экстракт флавоноидов *Epimedium*, где 1 - эпимедин В; 2 - эпимедин А; 3 - эпимедин С; 4 - икариин, IS – рутин [97].

Таблица 3 – Содержание флавоноидов в различных образцах горянки (мг/г) [97]

№ п/п	Образец	Эпимедин В	Эпимедин А	Эпимедин С	Икариин
1	<i>E. sagittatum Maxim.</i>	1,4	2,2	16,9	5,4
2	<i>E. sagittatum Maxim.</i>	5,7	6,9	26,9	16,3
3	<i>E. sagittatum Maxim.</i>	3,0	4,2	58,4	6,9
4	<i>E. pubescens Maxim.</i>	3,7	7,8	4,8	3,0
5	<i>E. wushanense T.S.Ying</i>	6,0	9,3	14,4	6,4
6	Общий экстракт флавоноидов <i>Epimedium</i>	39,0	72,4	125,1	172,1

КЭХ имеет ряд принципиальных достоинств по сравнению с другими хроматографическими методами: малый расход реагентов и растворителей, отсутствие насосов высокого давления и простота управления потоком подвижной фазы с помощью изменяемого напряжения, высокая скорость разделения [109]. Всё это стимулирует внедрение КЭХ в практику аналитических работ, поэтому круг объектов, анализируемых этим методом, достаточно широк, в том числе включает флавоноиды из некоторых растительных лекарственных трав [110-112].

Описан метод КЭХ [47], позволяющий одновременно определить семь флавоноидов: гександразид Е и F, кемпферол-3-О-рамнозид, икариин, эпимедин А, В, С и внутренний стандарт - байкалеин. Исследовано влияние таких параметров, как концентрация буферного раствора, рН и содержание ацетонитрила. Необходимое разделение (рис. 2) получили при использовании капилляра Hypersil C18 (3 мкм, 100 мкм × 25 см) и подвижной фазы, состоящей из 20 мМ фосфатного буферного раствора (рН 4.0): ацетонитрила (70: 30 по объёму) при 30 кВ и 25 °С в течение 20 мин. Предел обнаружения и минимально определяемое содержание составили 8,6 и 42,8 мкг/мл соответственно.

В табл. 4 представлены полученные результаты.

Таблица 4 – Содержание исследуемых компонентов в горянке (мг/г) [47]

№ п/п	Образец	Гександразид Е	Кемпферол-3-О-рамнозид	Гександразид F	Эпимедин А	Эпимедин В	Эпимедин С	Икариин
1	<i>E. brevicornum</i>	1,0	0,6	2,1	1,1	2,7	1,9	2,7
2	<i>E. sagittatum</i>	-*	-	9,4	1,1	0,7	6,8	1,3
3	<i>E. wushanense</i>	-	0,8	2,7	1,5	1,2	24,1	2,9
4	<i>E. pubescens</i> Гуанси	+**	-	1,2	1,7	1,9	5,4	6,3
5	<i>E. pubescens</i> Сычуань	+	-	0,8	2,2	2,9	10,5	2,8
6	<i>E. koreanum</i>	+	-	-	2,3	2,8	1,6	5,7
* аналит не обнаружен, ** содержание аналита ниже предела определения.								

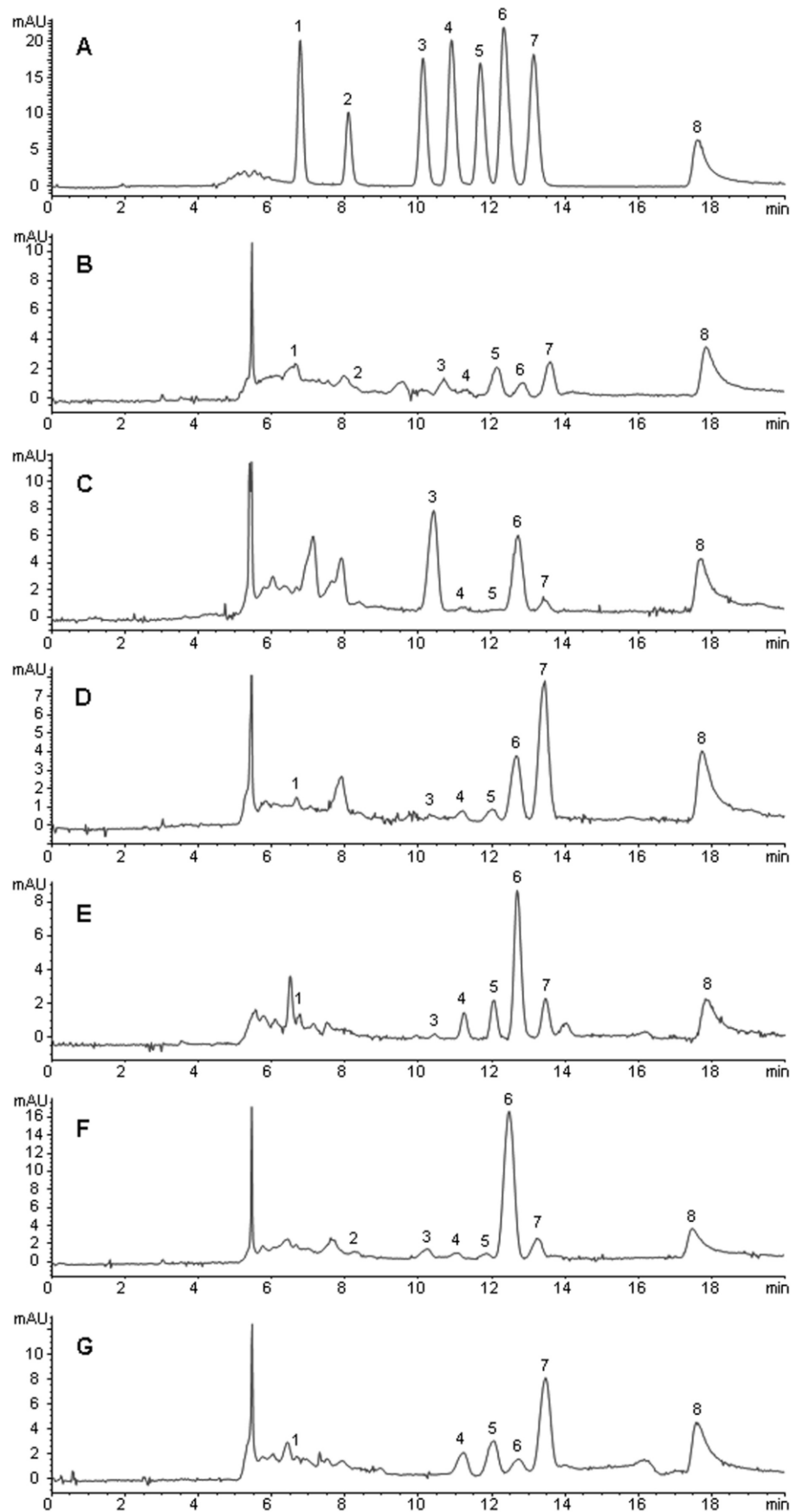


Рис. 2. Капиллярные электрохроматограммы (А) смеси стандартных растворов и экстрактов (В) *E. brevicornum*, (С) *E. sagittatum*, (D) *E. pubescens* из Гуанси, (Е) *E. pubescens* из Сычуань, (F) *E. wushanense* и (G) *E. koreanum*, где 1 - гександразид Е, 2 - кемпферол-3-о-рамнозид, 3 - гександразид F, 4 – эпимедин А, 5 - эпимедин В, 6 - эпимедин С, 7 – икариин, 8 – байкалеин [47].

Согласно данным, содержания семи исследуемых флавоноидов значительно отличаются между видами *Epimedium*, что может быть объяснено различными местами произрастания, временем сбора и условиями хранения. Данные табл. 2-4, указывают на необходимость контроля качества растительного сырья для проведения его стандартизации.

При сравнении двух методов следует отметить, что КЗЭ в отличие от КЭХ требует меньше времени, экономических затрат и технического обслуживания.

1.4.3 Газовая хроматография

ГХ используют для разделения газообразных, жидких и твёрдых веществ, которые должны удовлетворять определённым требованиям, главное из которых – летучесть. Если же соединение не обладает данным свойством, то предварительно проводят дериватизацию [113-115]. Её применение приводит к получению более летучих соединений, снижению полярности функциональных групп, и как следствие, улучшению хроматографических свойств веществ [116-118]. Наиболее популярным детектором в ГХ является пламенно-ионизационный. Однако в последнее время всё большую популярность приобретает комбинация ГХ и МС. Обычно для получения производных флавоноидов применяют триметилсилильные реагенты [119]. В работе [30] для определения икариина и десметиликаритина в качестве дериватирующих агентов использовали бис(триметилсилил)-N,O-трифторацетамид (БСТФА) и N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (МСТФА) и обнаружили, что продукты дериватизации с первым реагентом более стабильны (> 48 ч). В качестве катализатора для полного завершения реакции использовали пиридин (БСТФА: пиридин в соотношении 4: 1). Также провели исследования для определения оптимального времени дериватизации, которое составило 60 мин. При 30 мин обнаружили промежуточные продукты (рис. 3).

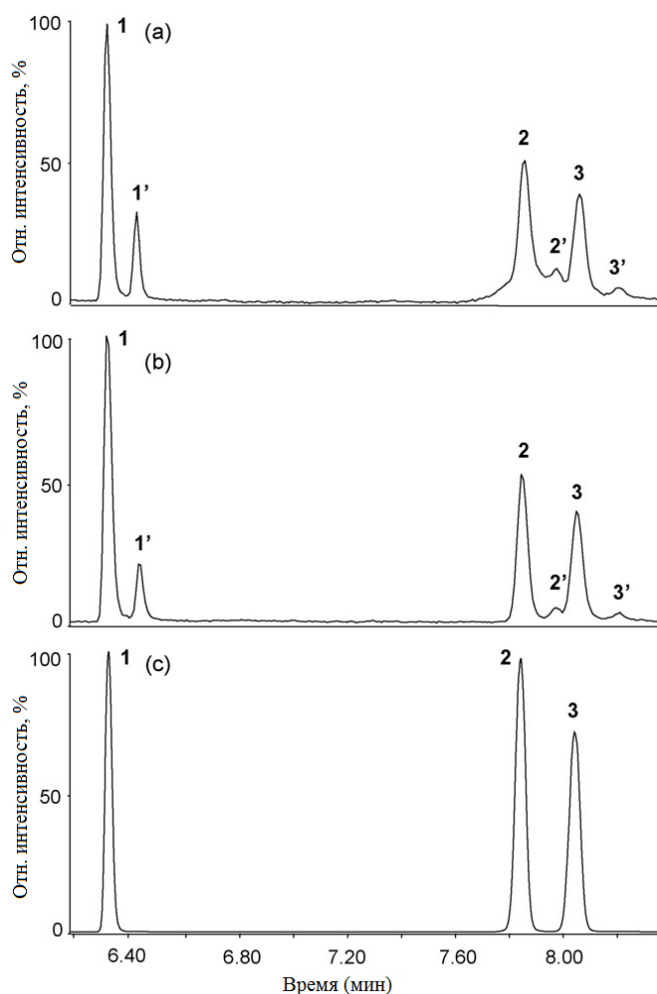


Рис. 3. Хроматограммы по полному ионному току ТМС-производных генистеина (внутреннего стандарта), икаритина и десметиликаритина после дериватизации в течение: а – 5 мин, б – 30 мин, с – 60 мин, где 1 – три-ТМС-производное генистеина, 1' – два-ТМС-производное генистеина, 2 – три-ТМС-производное икаритина, 2' - два-ТМС-производное икаритина, 3 – четыре-ТМС-производное десметиликаритина, 3' – три-ТМС-производное десметиликаритина [30].

В последние годы ГХ методы анализа становятся менее популярными, что отражается в снижении количества публикаций. Поскольку для определения флавоноидов горянки необходимо проведение дериватизации, увеличивающей время анализа, данный метод редко применяется в исследованиях растений рода *Epimedium*.

1.4.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ в сочетании с различными способами детектирования является одним из наиболее эффективных для идентификации, разделения и определения активных компонентов растений [120-125]. Общие сведения об определении активных компонентов горянки методом ВЭЖХ

систематизированы в табл. 5. Рассмотрим более подробно отдельные примеры.

Таблица 5 – Определение флавоноидов горянки методом ВЭЖХ

Объект анализа	Идентифицированные соединения	Неподвижная фаза; подвижная фаза; скорость потока; объём вводимой пробы	Детектор	Диапазон детектируемых масс (режим ионизации*), энергия фрагментации, ионные переходы	C_{min} , нг/мл	Литература
<i>E. brevicornum</i>	Икариин, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С	Zorbax SB-C8 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); ацетонитрил: 36% уксусная кислота в воде (4: 100); 1 мл/мин; 5 мкл	УФ, 272 нм	-	-	[41]
<i>E. koreanum</i>	Икариин, икаризид I, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С	Zorbax ODS C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); вода: ацетонитрил; 0,8 мл/мин; 10 мкл	ДМД, 270 нм; ESI-МС/МС	50-2000 Да (+), 677→531→369 531→369→313 839→677→531 809→677→531 823→677→531	-	[56]
<i>E. koreanum</i> , <i>E. brevicornum</i> , <i>E. pubescence</i> , <i>E. wushanense</i> , <i>E. sagittatum</i>	Икариин, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С	Zorbax Eclipse Plus-C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); метанол: ацетонитрил: 0,5 % раствор уксусной кислоты в воде; 1 мл/мин; 20 мкл	ДМД, 270 нм	-	-	[40]
<i>E. brevicornum</i> , <i>E. sagittatum</i> , <i>E. pubescence</i> , <i>E. wushanense</i> , <i>E. koreanum</i> , <i>E. acuminatum</i> , <i>E. myrianthum</i> , <i>E. franchetii</i> , <i>E. stellulatum</i> , <i>E. zhushanense</i> , <i>E. lishihchenii</i> , <i>E. davidii</i> , <i>E. fargesii</i>	Баохуозид I, баохуозид II, баохуозид VII, гександразид E, гександразид F, икариин, каохуозид C, кемпферол-3-О-рамнозид, 2'-О-рамнозил икаризид II, сагиттатозид A, сагиттатозид B,	Acquity VEN C18 (50 × 2,1 мм, 1,7 мкм); 50 мМ раствор уксусной кислоты в воде: ацетонитрил; 0,25 мл/мин; 1 мкл	ДМД, 270 нм	-	120 110 50 110 110 130 130 120 120 130 50	[39]

Объект анализа	Идентифицированные соединения	Неподвижная фаза; подвижная фаза; скорость потока; объём вводимой пробы	Детектор	Диапазон детектируемых масс (режим ионизации*), энергия фрагментации, ионные переходы	C_{min} , нг/мл	Литература
<i>E. hunanense</i> <i>E. leptorrhizum</i> <i>E. platypetalum</i> <i>E. sutchuenense</i>	эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С, эпимедозид С				50 120 50 120	
<i>E. koreanum</i> , <i>E. wushanense</i>	Икариин, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С, сагиттатозид В, 2''-О-рамнозил икаризид II, ангидро- икаритин, эпимедо- коранозид I	ХВ-С18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); 0,05 % раствор фосфорной кислоты в воде: ацетонитрил; 1,0 мл/мин; 10 мкл	ДМД, 270 нм;	-	-	[129]
<i>E. elatum</i>	Икариозид С, баоуозид II, эпимедозид А эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С, икариин	Zorbax Eclipse plus RP-C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); вода: ацетонитрил (75: 25); 0,5 мл/мин; 5 мкл	ДМД, 270 нм; ESI-МС	(+) 842→531→369 501→355 664→356 840→531→370 810→531→369 824→531→369 678→369	8,5 18,3 136,0 55,1 28,5 48,0 17,7	[126]
<i>E. brevicornum</i> , <i>E. sagittatum</i> , <i>E. pubescence</i> , <i>E. wushanense</i> , <i>E. koreanum</i> , <i>E. acuminatum</i> , <i>E. myrianthum</i> , <i>E. franchetii</i> , <i>E. stellulatum</i> , <i>E. zhushanense</i> , <i>E. lishihchenii</i> , <i>E. davidii</i>	Баоуозид I, баоуозид II, баоуозид VII, гександразид Е, гександразид F, икариин, каоуозид С, кемпферол-3-О- рамнозид, 2''-О-рамнозил икаризид II, сагиттатозид А, сагиттатозид В, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С, эпимедозид С	Zorbax SB-C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); вода: ацетонитрил; 1 мл/мин; 10 мкл	ДМД, 270 нм; ESI-МС для под- твер- ждения	100-1000 Да (+)	47 110 123 45 45 50 130 46 120 131 46 51 47 49 47	[52]

Объект анализа	Идентифицированные соединения	Неподвижная фаза; подвижная фаза; скорость потока; объём вводимой пробы	Детектор	Диапазон детектируемых масс (режим ионизации*), энергия фрагментации, ионные переходы	C_{min} , нг/мл	Литература
<i>E. koreanum</i>	51 активный компонент, в том числе: икариин, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С	RP18 (100 × 2,1 мм, 1,7 мкм); 0,3% раствор муравьиной кислоты в воде: ацетонитрил; 0,25 мл/мин; 2-10 мкл	ESI-МС/МС	(-), 25 В 721,23→367,12 837,28→367,12 807,27→367,12 821,29→367,12	-	[35]
Жиweiiling – лиофилизированный порошок, содержащий экстракт женьшеня и горянки	Икариин, иперин, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм); 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде: ацетонитрил; 0,7 мл/мин; 20 мкл	ESI-МС/МС	(-) 721,2→513,1 463,1→300,0 837,2→675,2 807,3→645,2 821,3→659,2	0,57 0,50 1,08 1,10 1,01	[36]
<i>E. koreanum</i> , <i>E. sagittatum</i>	Икариин, иперин, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С	Capcell Pak C18 (150 × 2,0 мм, 5 мкм); 5мМ формиат аммония в воде (рН 4,0): 90% ацетонитрил с 5 мМ формиатом аммония (рН 4,0); 0,3 мл/мин; 10 мкл	ESI-МС/МС	(+) 677→369 465→303 839→369 809→369 823→369	менее 500	[38]
<i>E. brevicornum</i> , <i>E. koreanum</i> , <i>E. pubescence</i> , <i>E. sagittatum</i> , <i>E. wushanense</i> , <i>E. acuminatum</i> , <i>E. myrianthum</i> , <i>E. truncatum</i> , <i>E. davidii</i> , <i>E. membranaceum</i>	Баохуозид I, икариин, сагиттатозид В, 2''-О-рамнозил икарисид II, эпимедин А, эпимедин В, эпимедин С, кверцетин (внутренний стандарт)	Zorbax SB-C18 (100 × 2,1 мм, 3,5 мкм); 0,3% раствор уксусной кислоты в воде: ацетонитрил; 0,2 мл/мин; 5 мкл	ESI-МС	(+) 515 677 647 661 839 809 823 303	3,7 – 9,1	[37]

Объект анализа	Идентифицированные соединения	Неподвижная фаза; подвижная фаза; скорость потока; объём вводимой пробы	Детектор	Диапазон детектируемых масс (режим ионизации*), энергия фрагментации, ионные переходы	C_{min} , нг/мл	Литература
<i>E. koreanum</i>	29 фенольных соединений, в том числе: гександразид E, икариин, икаризид I, икаризид II, каохуозид A, каохуозид B, эпимедин A, эпимедин B, эпимедин C, эпимедозид A	Zorbax SB-C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм); 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде: ацетонитрил; 1,0 мл/мин; 10 мкл	ESI-МС/МС	(-), 25 В 677→515→352 721→513→366 529→367→352 513→366→351 963→801→367 963→801→367 873→675→367 843→645→366 857→659→366 661→353→298	-	[127]
Примечание – * – режим ионизации: (+) - режим регистрации положительно заряженных ионов, (-) - режим регистрации отрицательно заряженных ионов						

Чаще всего для определения флавоноидов горянки используют обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. В качестве неподвижных фаз применяют различные гидрофобные сорбенты с привитыми алкильными радикалами (табл. 5). В большинстве случаев используют колонки со сферическими частицами сорбента диаметром 5 мкм, а иногда и менее 2 мкм (метод ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии) [35, 39]. Использование сорбентов с диаметром зерен не выше 2 мкм, позволяет сократить продолжительность анализа.

Разделение флавоноидов проводят, как правило, при элюировании смесями ацетонитрил-вода или метанол-вода с небольшим содержанием уксусной или муравьиной кислот [36, 40, 41]. Эти подвижные фазы удобны для разделения сложных смесей как флавоноидов, так и их гликозидов в условиях градиентного элюирования [39-41].

В качестве детекторов при определении действующих веществ горянки методом ВЭЖХ используют спектрофотометрические [41], диодно-матричные [39, 40, 52], масс-спектрометрические [36, 37, 127].

Спектрофотометрическое детектирование обычно проводят при 270 нм. С использованием метода ВЭЖХ-УФ исследовали пять видов горянки [128]. Наибольшее количество флавоноидов обнаружено в листьях горянки, затем в корнях и наименьшее в стеблях. Авторы работы [41] исследовали 10 представителей *E. brevicornum*, собранных во время цветения в различных местах Китая. Все образцы имели гораздо большее содержание действующих веществ (икариина 8,5 – 39,9 мг/г, эпимедина А 2,3 – 8,4 мг/г, эпимедина В 6,7 – 55,7 мг/г, эпимедина С 5,4 – 23,0 мг/г, общее содержание целевых веществ 29,1 – 123 мг/г), чем указано в китайской фармакопее (для икариина – 5 мг/г, общее содержание флавоноидов – 13 мг/г), что может негативно отразиться на безопасности биологически активных добавок или лекарственных средств на основе экстрактов горянки. Таким образом, контроль качества растительного сырья является важной и актуальной задачей.

При определении флавоноидов также применяют одновременную регистрацию при нескольких длинах волн - диодно-матричное детектирование [39, 40, 52]. Пределы обнаружения флавоноидов в таком случае обычно составляет 45 – 131 нг/мл. В работе [40] предложен способ автоматизированной классификации, упрощающий морфологическую таксономию видов *Epimedium*, с помощью ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. С помощью предложенного подхода возможно различить два схожих между собой вида *Epimedium koreanum* и *wushanense* [129].

В последние годы для идентификации и определения флавоноидов, присутствующих в лекарственных растениях и продуктах питания, все чаще используют метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) в условиях ионизации электрораспылением [37]. Действующие вещества горянки исследуют как в режиме регистрации положительно заряженных [38], так и отрицательно заряженных ионов [36]. В первом случае флавоноиды чаще всего образуют протонированные

молекулы $[M+H]^+$, а во втором – депротонированные молекулы $[M-H]^-$ и аддукты $[M+2H_2O-H]^-$, $[M+HCOOH-H]^-$ [36, 127].

Идентификация или подтверждение подлинности соединения – первый и важнейший шаг для создания количественного анализа. Информацию о структуре вещества можно получить с использованием тандемных масс-спектрометров [36, 127], а масс-спектрометрия высокого разрешения дает точную массу для определения брутто-формулы аналита [35].

С помощью тандемной масс-спектрометрии исследованы пути фрагментации фенольных соединений горянки [127]. Установлено, что пути фрагментации 3-О-, 7-О-, и 3,7-ди-О-гликозидов отличаются. Кроме того, с помощью разработанного ЖХ-МС/МС метода проанализировано распределение флавоноидов в семи видах горянки.

С использованием метода ВЭЖХ-МС/МС контролировали качество препарата Jiweiling, представляющего собой лиофилизированный порошок, содержащий экстракт женьшеня и горянки [36]. С помощью ВЭЖХ-МС/МС обнаружено 15 активных компонентов, содержащихся в этом лекарственном средстве.

1.5 Определение флавоноидов горянки в биопробах

При традиционном подходе установление особенностей фармакокинетики лекарственных средств проводится с использованием стандартных процедур подготовки биологических жидкостей, как правило, мочи или сыворотки (плазмы) крови, к анализу содержания биологически активных веществ (БАВ) и их метаболитов. Данные процедуры предполагают разбавление проб, корректировку их pH (подкисление, подщелачивание), экстракцию и повторную экстракцию (реэкстракцию) органическими растворителями, упаривание и химическое осушение, фильтрацию, последующую дополнительную обработку фракций в зависимости от кислотности определяемых соединений. Для определения флавоноидов горянки подготовка проб образцов мочи включает в себя

обессоливание органическим растворителем (ацетонитрилом [130], метанолом [131]) или разбавление водой [132]. Образцы желчи, сыворотки (плазмы) крови подвергают жидкостно-жидкостной экстракции этилацетатом, после чего органический слой упаривают досуха в токе азота и остаток восстанавливают подвижной фазой [133-136] или метанолом [137-141]. При исследовании фармакокинетических профилей и распределения по органам и тканям икариина [142] и икаритина [143] извлекают селезенку, почки, печень, легкое, сердце и головной мозг. Образцы тканей гомогенизируют и экстрагируют аналиты ацетонитрилом.

В настоящее время для определения флавоноидов горянки в биологических образцах применяют хроматографические методы со спектрофотометрическим детектированием в УФ-области [130, 144] и капиллярный зонный электрофорез [145], которые требуют обязательного наличия СО. При этом их чувствительность и достоверность идентификации достаточно низкая в сравнении с масс-спектральными методами анализа, а продолжительность анализа высокая.

В последние годы для идентификации и определения исследуемых соединений в биологических образцах все чаще используют метод ВЭЖХ-МС (МС/МС) в условиях ИЭР [133, 137, 139, 146, 147]. Так в работе [137] данный метод использовали при изучении фармакокинетики флавоноидов после приема стандартизованного экстракта *Epimedium*. В режиме мониторинга заданных реакций при регистрации отрицательно заряженных ионов установили, что максимальная концентрация икариина и икаризида II в крови достигается через 0,5-1 ч, а икаризида I, икаритина и десметиликаритина – через 8 ч. Такие же результаты были получены авторами работы [133, 148] при регистрации положительно заряженных ионов. Нижний предел количественного определения икариина в сыворотке крови составил 10 пг/мл [149]. Подготовка проб включала в себя проведение дериватизации (рис. 4), а детектирование осуществлялось в режиме

мониторинга заданных реакций при регистрации положительно заряженных ионов перехода m/z 910→764.

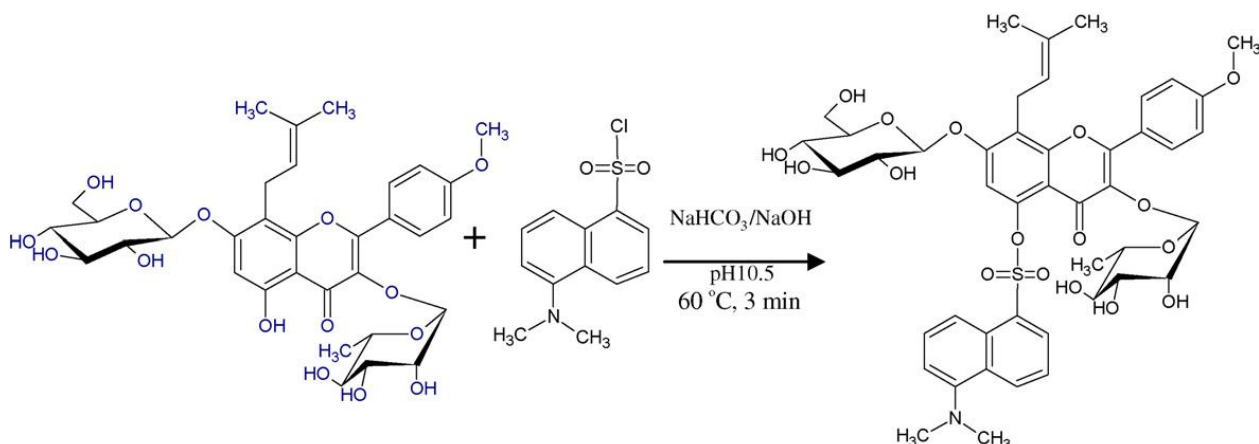


Рис. 4. Схема химической реакции дериватизации икариина [149].

Таким образом, применение метода ВЭЖХ-МС (МС/МС) для определения флавоноидов горянки в биологических образцах представляется перспективным.

1.6 Исследования метаболизма флавоноидов горянки

Биотрансформация – метаболическое превращение эндогенных и экзогенных химических веществ чаще всего в более полярные (гидрофильные) соединения. Обычно при биотрансформации свойства БАВ изменяются от липофильных, благоприятствующих абсорбции через липидные мембраны, к гидрофильным, способствующим почечной экскреции. Исключение из этого общего правила – выведение липофильных летучих соединений через органы дыхания. Изменение химической формы вещества при биотрансформации приводит и к изменению его биологической активности [150].

Биотрансформация большого числа соединений разных химических классов протекает с использованием ограниченного числа ферментов.

Процессы 1-й фазы биотрансформации – гидролиз, восстановление и окисление. Эти реакции обычно завершаются незначительным увеличением гидрофильности молекулы [151].

Процессы 2-й фазы биотрансформации включают глюкуронирование, сульфатирование, ацетилирование, метилирование, а также конъюгацию с аминокислотами и глутатионом. Эти процессы обычно завершаются увеличением гидрофильности и элиминации [152].

Процессы биотрансформации многочисленных соединений катализируются ограниченным числом ферментов. В некоторых случаях синтез этих ферментов усиливается при абсорбции вещества (индукция фермента), но обычно внешние факторы не влияют на процесс синтеза фермента.

Ферменты биотрансформации распределены по всему организму и присутствуют в основном в микросомах и в цитозоле; незначительная часть ферментов локализуется в митохондриях, ядре и лизосомах (табл. 6) [153].

Таблица 6 – Основные реакции биотрансформации БАВ и их локализация [153]

Реакция	Фермент	Локализация
1-я фаза		
Гидролиз	Эстераза	Микросомы, цитозоль, лизосомы
	Пептидаза	Лизосомы, внеклеточно в крови
	Эпоксид гидролаза	Микросомы, цитозоль
Восстановление	Ферменты восстановления азо-(-N=N-) и нитро- (-NO ₂) групп	Микросомы, цитозоль, в составе микрофлоры
	Ферменты восстановления карбонильной группы (C=O)	Цитозоль, микросомы
	Ферменты восстановления дисульфидов (RS-SR)	Цитозоль
	Ферменты восстановления сульфоксидов (R ₂ S=O)	Цитозоль
	Ферменты восстановления хинонов	Микросомы, цитозоль, митохондрии
	Ферменты восстановительного дегалогенирования	Микросомы
Окисление	Алкогольдегидрогеназа	Цитозоль
	Альдегиддегидрогеназа	Митохондрии, цитозоль
	Альдегидоксидаза	Цитозоль
	Ксантинооксидаза	Цитозоль

Реакция	Фермент	Локализация
	Моноаминоксидаза	Митохондрии
	Диаминоксидаза	Цитозоль
	Простагландин - Н - синтетаза	Микросомы
	Флавин-монооксигеназа	Микросомы
	Цитохром P450	Микросомы
2-я фаза		
	Ферменты конъюгации с глюкуроновой кислотой	Микросомы
	Ферменты конъюгации с сульфатом	Цитозоль
	Ферменты конъюгации с глутатионом	Цитозоль, микросомы
	Ферменты конъюгации с аминокислотами	Митохондрии, микросомы
	Ацетилирование	Митохондрии, цитозоль
	Метилирование	Цитозоль, микросомы

У позвоночных печень – наиболее богатый источник ферментов, катализирующих реакции биотрансформации. Ферменты находят в желудочно-кишечном тракте, легких, почках, коже, слизистой оболочке носа, в тканях глаза и других тканях. Важную роль в метаболизме некоторых соединений играет кишечная микрофлора.

Таким образом, биотрансформация осуществляется преимущественно в печени, но может проходить в стенке желудка и кишечника, в почках, сердце, легких, мозге и в крови. Все изменения токсичных веществ до поступления в системный кровоток называются пресистемным метаболизмом. Некоторые соединения, достигнув кровяного русла, подвергаются изменению в самой крови (табл. 6) [154].

В последние десятилетия проблема определения метаболитов действующих компонентов лекарственных растений в сложных биологических матрицах приобретает всё большую актуальность [155-160]. Методы обнаружения и идентификации метаболитов можно разделить на три

основные категории [131]. Если известны или предсказуемы метаболические реакции, например такие как гидроксирование или деалкилирование, то метаболиты можно обнаружить по молекулярным массам [161-163]. Ко второй категории относятся методы анализа, основанные на данных масс-спектрометрии высокого разрешения (на основании дефектов масс [161-166], с использованием изотопного фильтра [167, 168] или вычитания фона [161-163, 169, 170]). Третья категория включает в себя метод тандемной масс-спектрометрии (регистрация ион-продуктов [161-163, 171], нейтральных потерь [161-163]). После того, как метаболит был обнаружен одним из вышеуказанных способов, его структура может быть идентифицирована в соответствии с правилами фрагментации данного класса соединений [162-165]. Определение изотопного состава может также использоваться при идентификации метаболитов [172].

Результаты исследований метаболических процессов флавоноидов горянки в опытах на лабораторных животных, полученных с использованием различных инструментальных методов анализа, таких как капиллярный электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с УФ-детектированием или в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, представлены в работах [132, 135, 144, 145]. Однако данные методы основаны на определении соединений с известной структурой и подразумевают наличие СО аналитов. В работе [173] исследовали метаболизм одного из флавоноидов горянки – икаритина. В качестве объекта исследования выбрали образцы плазмы и мочи крыс после жидкостно-жидкостной экстракции этилацетатом. Для выявления возможных метаболитов сравнивали хроматограммы в режиме сканирования в заданном диапазоне масс биологических образцов после перорального введения с бланковыми. Обнаруженные соединения подвергались диссоциации, индуцируемой соударением. По полученным фрагментам устанавливали структуры метаболитов. Таким образом, были выявлены следующие процессы биотрансформации икаритина: глюкуронирование,

гликозилирование, сульфатация, деметилирование, гидрирование и окисление. Основными недостатками данного подхода являются ограниченность, связанная с трудностями идентификации метаболитов малых концентраций, трудоёмкость, вызванная необходимостью внимательного и долгого поиска различий в хроматограммах биологических образцов и бланковых.

В работах [130, 134, 174] предложен способ идентификации метаболитов флавоноидов горянки с использованием ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения (многомерная масс-спектрометрия) с применением алгоритмов зависимого сканирования. В работах выявлено, что дегликозилирование и глюкуронирование является основными фазами биотрансформации флавоноидов горянки. Однако этот метод не является селективным по отношению к метаболитам биологически активных веществ горянки и обработка полученных инструментальных данных без соответствующего программного обеспечения в ручном режиме является сложной задачей, сопряжённой с большими временными затратами.

Большое исследование провели авторы работы [131]. Они предложили новую стратегию открытия и идентификации метаболитов с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрией высокого разрешения и способа, основанного на сходстве масс-спектральных деревьев. Потенциальные метаболиты были обнаружены на основе сходства их спектральных деревьев с известными соединениями или метаболитами. Данный подход состоял из четырёх этапов. Первый заключался в получении МСⁿ-спектров (n=1-3) в режиме зависимого сканирования с предварительно установленными значениями интенсивностей ионов-предшественников. Второй этап состоял в преобразовании полученных данных в масс-спектральные деревья. Третий шаг заключался в создании библиотеки. Четвёртый этап состоял в сравнении экспериментальных масс потенциальных метаболитов с теоретическими значениями. С помощью этого способа авторам удалось идентифицировать 115 метаболитов. Следует отметить, что авторы работы не привели все

структуры обнаруженных соединений. А данный подход имеет ряд существенных недостатков: во-первых, необходимо использование специального программного обеспечения для создания масс-спектральных деревьев, во-вторых, для идентификации метаболитов необходимо получить чистые тандемные спектры аналитов, что сложно реализовать при анализе таких многокомпонентных биологических матриц, так как вследствие большого количества соединений, малой концентрации метаболитов происходит перекрывание и искажение масс-спектров. Необходимо проведение серьёзной подготовки проб для избавления от мешающих компонентов, однако авторы проводят только осаждение белков метанолом, концентрирование в токе азота, высокоскоростное центрифугирование и анализ надосадочной жидкости. В работе исследователями с помощью фильтра нейтральных потерь выявлено только несколько ложноположительных результатов. Возможно, использование данного фильтра при получении тандемных масс-спектров будет более целесообразно, поскольку позволит значительно сократить объём получаемых масс-спектральных данных и при этом исключить ложноположительные результаты. Отсутствие информации о чувствительности и селективности предложенного метода, не позволяет оценить корректность предложенного способа.

Таким образом, необходима разработка селективного метода с высокой чувствительностью и экспрессностью для обнаружения не только мажорных, но и минорных метаболитов флавоноидов горянки в моче крыс.

В последние годы для автоматизированного поиска метаболитов всё чаще используют различные варианты специализированного программного обеспечения, позволяющего из значительных по объёму массивов хромато-масс-спектрометрических данных в автоматическом режиме извлекать характеристические ионы, соответствующие продуктам биотрансформации исследуемых соединений. Соответствующие программные пакеты предлагаются ведущими производителями хроматографического и масс-

спектрометрического оборудования: Thermo MetWorks, Agilent MassHunter Metabolite ID, Waters MetaboLynx, Shimadzu MetID Solution. Общий алгоритм работы этих программ состоит в следующем: в качестве исходных данных используются масс-хроматограммы, полученные в результате анализа контрольного (до приема препарата) и опытного (после приема препарата) образцов биологических жидкостей. Данные могут обрабатываться как в паре (контроль-опыт), так и в виде пакетов (все контрольные – все опытные образцы, включая данные повторных анализов одних и тех же проб). Также в программу вводится брутто-формула исследуемого соединения для расчета его точной массы и/или результаты его хроматомасс-спектрометрического анализа в чистом виде или в виде использованной в экспериментах лекарственной формы. В зависимости от возможностей применяемого оборудования и метода анализа программное обеспечение формирует перечень обнаруженных метаболитов с учётом уровня их статистической достоверности путём сравнения значений точных масс ионов, характера их фрагментации и проверки изотопных соотношений. При этом используются интегрированные базы данных о возможных путях биохимической трансформации ксенобиотиков в различных реакциях (окисления, восстановления, гидролиза, алкилирования, деалкилирования, фосфорилирования, сульфатирования, глюкуронирования, карбоксилирования и др.).

MetQuest также позволяет работать с большим объёмом экспериментальных данных. С помощью данной программы можно проводить фармакокинетические исследования проб биоматериалов, выявлять метаболиты целевого соединения и исследовать изменения содержания аналита и его метаболитов от времени в автоматическом режиме.

Программный комплекс MetWorks фирмы «Thermo Scientific» (США) позволяет анализировать масс-спектральные данные в формате Xcalibur RAW file и идентифицировать метаболиты, образующиеся в результате модификаций известных целевых веществ при воздействии различных

ферментов организма. При проведении протеомных и метаболомных исследований биопроб для изучения фармакологических и токсикологических показателей используют программу статистического и масс-спектрального анализа массивов экспериментальных данных SIEVE. ACD/Labs версии 12.0 и ACD/Percepta позволяют по структуре соединения прогнозировать его физико-химические, токсикологические и фармакологические свойства. Данные пакеты прикладных программ предсказывают возможные метаболические процессы при воздействии на соединение ферментов семейства Цитохромов Р 450 и фармакокинетические параметры аналита при различных путях вывода из организма.

Программа Mass Frontier 7.0 HighChem позволяет проводить библиотечный поиск масс-спектральных данных, рассчитывать и предсказывать масс-спектральную фрагментацию для различных типов ионизации и диссоциации молекулы целевого соединения.

Данное программное обеспечение также может быть сопряжено с системами предиктивного метаболизма, позволяющими прогнозировать возможные биотрансформации любого соединения в организме человека и лабораторных животных, такими как, например Meteor, разработанной компанией LHASA (Logic and Heuristics Applied to Synthetic Analysis).

Таким образом, внедрение в лабораторную практику современных методов хроматографии в сочетании с гибридной многомерной масс-спектрометрией высокого разрешения в комплексе со специализированным программным обеспечением для анализа данных может служить основой разработки методик определения метаболитов.

* * *

В настоящее время ВЭЖХ–УФ и КЗЭ являются самыми распространенными методами контроля содержания флавоноидов в растительном сырье, экстрактах и продуктах на их основе. Их выбор обусловлен доступностью, простотой и распространенностью в

аналитических лабораториях. Однако ограничением этих методов является необходимость использования СО.

Использование ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием позволяет идентифицировать действующие вещества горянки, а также получить важную информацию об их структуре (например, молекулярную массу). Растения различных видов горянки отличаются по составу флавоноидов, что и выясняется с использованием методов ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС. Кроме того, данные технологии можно применять в качестве чувствительных и селективных способов количественной оценки содержания флавоноидов. Несмотря на высокую цену данных методов и сложность для рутинного анализа, их с успехом используют в изучении параметров фармакокинетики и метаболомики, при этом простейшим и наиболее распространенным способом подготовки биологических проб является осаждение белков и обессоливание органическим растворителем. Однако из-за сложного многокомпонентного состава биологических проб, влияющего на процесс ионизации аналитов в масс-спектрометре необходимо тщательно исследовать эффект матрицы, так как он вносит значительный вклад в ошибку определения [175, 176].

Подготовка образцов является одним из важных этапов в исследовании горянки. Чаще всего для извлечения флавоноидов из растительного сырья используют экстракцию (метанолом и этанолом). Применение ультразвука и микроволнового поля позволяет уменьшить время экстракции и увеличить эффективность. В настоящее время в печати отсутствуют сведения, посвящённые перспективным исследованиям выделения активных компонентов из горянки с использованием растворителей, находящихся в сверхкритическом состоянии, в том числе диоксида углерода. Однако сверхкритическая экстракция обладает рядом преимуществ по сравнению с другими способами извлечения: обеспечиваются экологичность, быстрота процесса, высокий выход конечного продукта; низкая температура

экстракции; исключается проблема остаточного растворителя в экстракте [177-182].

В последнее время для идентификации действующих компонентов горянки и их метаболитов в биологических образцах используется метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения и многомерной масс-спектрометрией с применением алгоритмов независимого сканирования. Однако обработка полученных инструментальных данных требует соответствующего программного обеспечения и больших временных затрат. Поэтому необходимо разработать селективный метод с высокой чувствительностью и экспрессностью для идентификации метаболитов флавоноидов горянки в биологических образцах, который позволит не только обезопасить применение людьми лекарственных растений традиционной медицины, но и выявить, изучить пути метаболизма и биологического действия действующих веществ в живом организме.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Реактивы и материалы

В работе использовали следующие реактивы и материалы:

- кислота серная концентрированная («Sigma», США), калий двуххромовокислый («Sigma», США) – для подготовки посуды;
- метиловый спирт (метанол) и этиловый спирт (этанол) для градиентной ВЭЖХ («Merck», Германия) – в качестве растворителя СО;
- ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ («Merck», Германия), муравьиная кислота («Fluka», Германия) – для приготовления подвижных фаз;
- картриджи для сорбционного концентрирования (ТФЭ) HLB и DSC-18 вместимостью 6 мл с массой сорбента 200 мг («Supelco», Германия) – для подготовки биопроб;
- хлористый метилен («МедХимПром», Россия), диэтиловый эфир («МедХимПром», Россия), трет-бутилметиловый эфир («Panreac», Испания), гексан («МедХимПром», Россия), изобутиловый спирт («LiChrosolv®», Германия), изопропиловый спирт («LiChrosolv®», Германия), этилацетат («Chromasolv®», Германия) – для проведения жидкостно-жидкостной экстракции;
- безводный дигидрофосфат калия («Merck», Германия) и 12-водный гидрофосфат натрия («Merck», Германия) – для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 6,5;
 - хлорид натрия («Sigma-Aldrich», Германия);
 - концентрированная соляная кислота («ХимМед», Россия);
 - карбонат и гидрокарбонат калия («ХимМед», Россия) – для приготовления карбонатного буферного раствора с рН 10,0;
 - бета-глюкуронидаза из E-coli K 12 (раствор в 50% глицерине, «Roche diagnostics GmbH», Германия) – для ферментативного гидролиза;

- калибровочные растворы для QExactive и Orbitrap Fusion («Thermo Scientific», США) – для калибровки масс-спектрометров.

Все используемые реагенты и растворители были аналитической степени чистоты, растворы для подготовки проб готовили с применением деионизованной воды.

2.2 Стандартные образцы

В работе использовали следующие СО:

- икариин («PhytoLab», Германия);
- икаритин («PhytoLab», Германия);
- икаризид I («PhytoLab», Германия);
- икаризид II («PhytoLab», Германия);
- эпимедин А («PhytoLab», Германия);
- эпимедин В («PhytoLab», Германия);
- эпимедин С («PhytoLab», Германия);
- куместрол («Sigma», США) в качестве внутреннего стандарта.

Содержание основных веществ в СО составляло не менее 95%.

2.3 Исследуемые образцы

В работе исследовали следующие образцы растительных материалов и коммерческих продуктов на основе горянки:

- высушенный этанольный экстракт горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*, номер партии: С20110705, Прикладная биотехнология, Россия), представляющий собой порошок горчичного цвета;
- гранулированный чай с экстрактом горянки корейской (*Epimedium koreanum*, производитель: государственная корпорация здравоохранения «Маннён», Северная Корея);
- настойка из горянки корейской (*Epimedium koreanum*, государственная корпорация здравоохранения «Маннён», Северная Корея), представляющая собой вязкую жидкость тёмно-коричневого цвета;

- высушенные в тени в проветриваемом помещении при температуре 35-38 °С листья горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*), с востока Китая.

2.4 Оборудование, вспомогательные устройства, средства измерений и программное обеспечение

В работе использовали следующее оборудование и средства измерений:

- высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000, оснащенный автосамплером Dionex Ultimate 3000 RS Autosampler, градиентным насосом Dionex Ultimate 3000 RS Pump, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки, соединенным с гибридным масс-спектрометром QExactive с квадрупольным масс-анализатором и с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения («Thermo Scientific», США), с возможностью использовать источники ионизации IonMax HESI-II и APCI;

- высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000, оснащенный автосамплером Dionex Ultimate 3000 RS Autosampler, градиентным насосом Dionex Ultimate 3000 RS Pump, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки, соединенный с трибридным масс-спектрометром Orbitrap Fusion с квадрупольным масс-анализатором, с линейной ионной ловушкой и с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения («Thermo Scientific», США) и источником ионизации EASY-Max-NGTM;

- экстракцию сверхкритическим диоксидом углерода осуществляли на лабораторной установке производства компании «Waters Corporation», США, модели SFE-100;

- взвешивание навесок проводили на лабораторных электронных весах XP Analytical модель XP-56 с погрешностью $\pm 0,000001$ г и диапазоном взвешивания от 0,00001 до 52,0 г («Mettler Toledo», Швейцария);

- для отбора жидкостей использовали дозаторы переменного объема 10-100; 100-1000; 1000-5000 мкл и наконечники для дозаторов вместимостью 0,1-10,0; 10,0-100,0; 50,0-1000,0; 1000,0-10000,0 мкл («Biohit», Германия).

Вспомогательное оборудование, применяемое при исследовании:

- для получения азота, используемого в качестве распыляющего и вспомогательного газа, применяли генератор Genius 1022 («Peak Scientific», Шотландия);

- хроматографическое разделение осуществляли на колонке Hypersil Gold aQ, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм с предколонкой («Thermo Scientific», США);

- для получения деионизованной воды использовали дистиллятор «ДЭ-4-2М» (Россия), установку NANOPure («Thermo Scientific», США);

- иономер лабораторный, тип И-160МИ (ООО «Измерительная техника», Россия);

- для подготовки проб применяли шкаф сушильный типа SNOL 67/350, диапазон автоматического регулирования температур (50-350) °С («СНОЛ», Россия); центрифугу низкоскоростную, обеспечивающую максимальную скорость вращения до 4400 об./мин («Eppendorf», Германия); орбитальный шейкер с максимальной скоростью вращения 3000 об./мин производства («IKA», Германия); фильтровальные насадки на шприц Spartan диаметром 30 мм с размером пор 0,20 мкм и шприц Spartan вместимостью 10 мл («Whatman», Великобритания); целлюлозные фильтры с размером пор 0,45 мкм («Macherey-Nagel», Германия);

- для перемешивания растворов применяли ультразвуковую ванную (УЗВ) («Серьга», Россия);

- для упаривания использовали упариватель-концентратор на 6 портов («Supelco», США);

- для хранения проб, реактивов и стандартных образцов применяли холодильник медицинский с морозильной камерой («SANYO», Япония);

- для ТФЭ использовали вакуумную установку (Манифолд) («Supelco», Германия).

В работе применяли следующее программное обеспечение:

- регистрацию и обработку хроматограмм проводили с помощью программных пакетов Xcalibur версии 2.2 и 3.0 («Thermo Scientific», США);
- предполагаемые структуры фрагментных ионов аналитов получали с помощью программ HighChem Mass Frontier версии 7.0 и HyperChem версии 7;
- с использованием программы метаболомного анализа MetWorks версии 1.3 обнаружили метаболиты, образующиеся в результате модификаций известных целевых веществ;
- с помощью программных комплексов ACDLabs (biotransformation maps) версии 12.0 и ACDLabs/Percepta версии 12.0 предсказывали возможные метаболические процессы при воздействии на соединения ферментов семейства Цитохромов P 450.

2.6 Приготовление рабочих и буферных растворов

Перед взвешиванием или разбавлением растворы и субстанции нагревали до комнатной температуры.

2.6.1 Подготовка посуды

Посуда, используемая для приготовления растворов и аналитических измерений, замачивалась на (3-4) часа в свежеприготовленном 3%-ном растворе двуххромовокислого калия в серной кислоте (5 г двуххромовокислого калия на 100 мл концентрированной серной кислоты). Далее отмывали в проточной воде с последующим многократным ополаскиванием дистиллированной водой. После высушивания в сушильном шкафу при температуре 150 °С посуду хранили герметично закрытой без доступа влаги.

2.6.2 Подготовка деионизованной воды

С использованием дистиллятора получали дистиллированную воду, применяемую для приготовления элюентов, затем её пропускали через установку для получения деионизованной воды, при этом удельное электрическое сопротивление составляло не менее 18 МОм·см. Далее с помощью рН-метра определяли значение рН полученной воды, которое находилось в пределах от 5,4 до 6,6.

2.6.3 Приготовление фосфатного буферного раствора

На аналитических весах взвешивали 14,3 г гидрофосфата натрия, 5,5 г дигидрофосфата калия и растворяли в 100 мл деионизованной воды.

Иономером лабораторным измеряли рН буферного раствора. Данный показатель должен быть в пределах от 6,5 до 6,9. Если значение рН превышало 6,9 – его понижали путем добавления дигидрофосфата калия.

Так как фосфатный буфер подвержен бактериальному загрязнению, при котором он мутнеет, для его стабилизации добавляли азид натрия в концентрации 0,1%.

2.6.4 Приготовление карбонатного буферного раствора

На аналитических весах взвешивали 7,5 г гидрокарбоната калия, 7,5 г карбоната калия и растворяли в 100 мл деионизованной воды.

Иономером лабораторным измеряли рН буферного раствора. Данный показатель должен быть в пределах от 9,9 до 10,4. Если значение рН превышало 10,4 – его понижали путем добавления гидрокарбоната калия.

2.6.5 Приготовление растворов стандартных образцов

Растворы шести флавоноидов горянки (икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов A, B) и куместрола с концентрациями 1 мг/мл готовили растворением точных навесок 10 мг в 10 мл метанола, после чего разбавлением готовили аттестованную смесь (АС) с концентрацией

икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A и эпимедина B 0,1 мг/мл.

2.6.6 Приготовление градуировочных растворов икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A и эпимедина B в метиловом спирте

Из АС икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A и эпимедина B с концентрацией 0,1 мг/мл путем смешивания и кратного разбавления метиловым спиртом готовили десять ГР, концентрации приготовления которых указаны в табл. 7.

ГР готовили в тот же день, что и АС.

Таблица 7 – Концентрации ГР икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A и эпимедина B в метиловом спирте

Приготавливаемый раствор		Раствор АС или ГР, используемый для разведения		Метиловый спирт
№№ ГР	Концентрация компонента, мг/мл	Концентрация компонента, мг/мл	Объём, мл	Объём, мл
1	$5,0 \times 10^{-2}$	0,1	5,0	5,0
2	$2,5 \times 10^{-2}$	0,1	2,5	7,5
3	$1,0 \times 10^{-2}$	0,1	1,0	9,0
4	$5,0 \times 10^{-3}$	0,1	0,5	9,5
5	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	1,0	9,0
6	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-3}$	1,0	9,0
7	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	1,0	9,0
8	$5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-4}$	1,0	9,0
9	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	1,0	9,0
10	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$	1,0	9,0

2.6.7 Приготовление подвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для проведения хроматографического анализа использовалась двухкомпонентная подвижная жидкая фаза:

– компонент А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в смеси деионизированной воды с ацетонитрилом марки «для ВЭЖХ» в соотношении компонентов 95:5 (объем.);

– компонент В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле марки «для ВЭЖХ».

Для приготовления 0,1% раствора муравьиной кислоты в смеси деионизированной воды с ацетонитрилом (в соотношении компонентов 95:5 объем.) в мерном цилиндре емкостью 1000 мл смешивали 1,0 мл муравьиной кислоты, 50,0 мл ацетонитрила марки «для ВЭЖХ» и затем доводили до метки деионизированной водой. Приготовленный раствор плотно закрывали крышкой и тщательно перемешивали.

Для приготовления 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле в 1000 мл ацетонитрила вносили 1,0 мл муравьиной кислоты и тщательно перемешивали раствор.

2.7 Техника эксперимента

2.7.1 Схема эксперимента по исследованию процессов масс-фрагментации и оптимизации энергии соударений

Растворы куместрола (рис. 5) и шести СО флавоноидов горянки: икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А и эпимедина В (табл. 8) с концентрациями 10 мкг/мл готовили последовательным разбавлением метиловым спиртом исходных растворов с концентрациями 1 мг/мл, приготовленных согласно разд. 2.6.5.

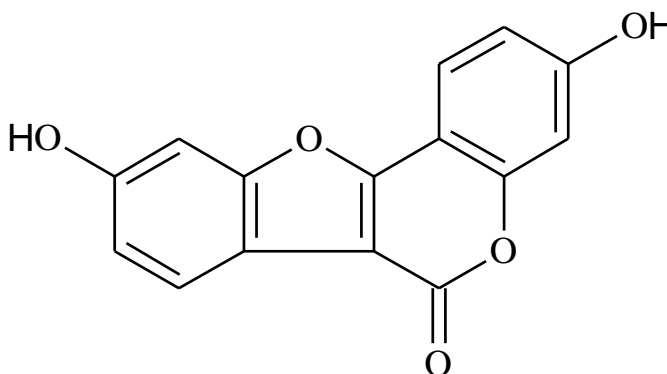
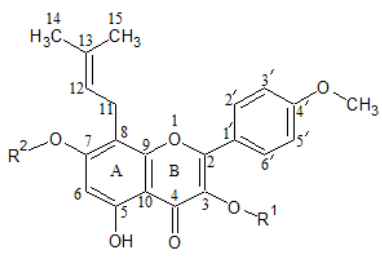


Рис. 5. Структурная формула куместрола (брутто-формула $C_{15}H_8O_5$, $M=268,0372$).

Таблица 8 – Структурные формулы основных флавоноидов горянки

№ п/п	Название соединения			Брутто-формула	Моноизотопная масса, Да
		R ¹	R ²		
1	Икариин	rha	glu	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	676,2362
2	Икаритин	H	H	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368,1260
3	Икаризид I	H	glu	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	530,1788
4	Икаризид II	rha	H	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	514,1839
5	Эпимедин А	rha-(1-2)glu	glu	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	838,2895
6	Эпимедин В	rha-(1-2)xyl	glu	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	808,2790

Примечание: rha – рамнозил, glu – глюкозил, xyl - ксилозил

Определение проводили с использованием источников ионов с ИЭР и ХИАД, соединённых с гибридным масс-спектрометром QExactive с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения. Ток коронного разряда составлял 2 мкА (в случае использования ХИАД), напряжение на капилляре – 3,5 кВ; температура капилляра – 320 °С; температура на распылителе – 280 °С; скорость потока распыляющего газа (азот) – 0,40 л/мин; скорость потока вспомогательного газа (азот) – 0,1 л/мин; скорость потока газа-осушителя (азот) – 0,05 л/мин. Детектирование осуществляли в диапазоне масс 100–1500 Да и 80–1200 Да при регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов, соответственно, с разрешением 35 000 (на половине высоты) и точностью определения масс 5 миллионных долей (м.д.). Масс-спектры фрагментных ионов получали высокоэнергетической диссоциацией соударением (HCD), варьируя энергии в диапазоне 10–70 В с шагом 10 В. Обработку данных проводили с

применением программного обеспечения Xcalibur версии 2.2. Предполагаемые структуры фрагментных ионов действующего вещества получали с помощью программ HighChem Mass Frontier версии 7.0 и HyperChem версии 7.

В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 5 : 95 (об.) (А) и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (В), приготовленные согласно разд. 2.6.7. Хроматографическое разделение веществ проводили в режиме градиентного элюирования: 0–2 мин — 5% В; 15 мин — 95% В; 15–18 мин — 95% В; 19–23 мин — 5% В. Температура колонки составляла 30 °С, скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 23 мин. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

2.7.2 Схема эксперимента по определению флавоноидов горянки в растительных материалах и продуктах на их основе

Подготовка проб. Отбирали 1 г исследуемого сырья (высушенного этанольного экстракта горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*), гранулированного чая с экстрактом горянки корейской (*Epimedium koreanum*) и настойки из горянки корейской (*Epimedium koreanum*)) и добавляли 10 мл экстрагента (70% раствор этанола в воде). Смесь нагревали до 35 °С на УЗВ в течение 30 мин. После этого 1 мл экстракта отбирали и затем центрифугировали 12 мин при 16 000 об/мин. Надосадочный слой жидкости исследовали хроматомасс-спектрометрически.

Условия работы масс-спектрометрического детектора. Условия масс-спектрометрического детектирования приведены в табл. 9.

Таблица 9 – Условия масс-спектрометрического детектирования

Наименование параметра	Значение
Масс-спектрометрический детектор	Масс-спектрометр высокого разрешения QExactive с источником ионизации HESI-II

Наименование параметра	Значение
Режим источника ионизации	Ионизация электростатическим распылением
Режим детектирования	Детектирование в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM) при регистрации положительно заряженных ионов
Разрешающая способность	35000
Тип ячейки соударительной диссоциации	Ячейка высокоэнергетической соударительной диссоциации (HCD)
Скорость потока газа-осушителя	5 ед.
Скорость потока вспомогательного газа	10 ед.
Скорость потока газа на распылителе	40 ед.
Напряжение на капилляре	4.0 кВ
Температура на распылителе	280 °С
Температура капилляра	270 °С

Процедуру калибровки масс-спектрометра с орбитальной ионной ловушкой проводили с использованием калибровочного раствора. Для сбора и обработки масс-спектрометрических данных использовалась программа Xcalibur версии 2.2.

Условия хроматографического разделения.

Подвижная фаза – компонент А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в смеси деионизированной воды с ацетонитрилом марки «для ВЭЖХ» в соотношении компонентов 95:5 (объем.);

– компонент В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле марки «для ВЭЖХ».

Температура 45 °С

термостата колонки

Объем ввода пробы 5 мкл

Время анализа 15 мин

Режим градиентный

хроматографического
элюирования

Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы		Скорость потока, мл/мин
	A, %	B, %	
0,0	80	20	0,6
1,0	80	20	0,6
4,0	75	25	0,6
4,5	60	40	0,6
7,5	5	95	0,6
10,5	5	95	0,6
11,0	80	20	0,6

2.7.3 Схема эксперимента по разработке способа извлечения основных компонентов горянки из растительных материалов сверхкритическим диоксидом углерода

Для экстракции основных компонентов горянки использовали листья *Epimedium brevicornum* из одной партии лекарственного растительного сырья. Листья горянки измельчали до 6-8 мм, отбирали 5,0 г и экстрагировали при температурах от 40 до 60 °С с шагом 5 °С и давлениях от 10 до 30 МПа с шагом 5 МПа в течение 15, 30 и 45 мин. В качестве со-растворителя использовали 80%-ный этанол. Скорости подачи со-растворителя и углекислого газа составляли 3 и 7 г/мин, соответственно.

Для сравнительной оценки эффективности экстракции сверхкритическим диоксидом углерода были также получены спиртовые экстракты ультразвуковым методом с использованием оптимизированных параметров, приведённых в работе [48]. К 1 г измельчённого сырья добавляли 30 мл экстрагента (50%-ный раствор этанола в воде). Смесь выдерживали в ультразвуковой бане при 50 °С в течение 30 мин. После этого отбирали 1 мл экстракта, центрифугировали 12 мин при 16000 об./мин, пропускали через бумажный фильтр с размером пор 0,45 мкм и исследовали хроматомасс-спектрометрически. Проводили три последовательные этанольные экстракции.

Количественный анализ полученных экстрактов осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС в условиях, представленных в разд. 2.7.2.

2.7.4 Схема эксперимента по разработке способа определения действующих соединений горянки в биологических пробах

Анализ после разбавления. К образцу мочи (5 мл) добавляли 0,05 мл внутреннего стандарта, содержащего куместрол (с концентрацией 10 мкг/мл, полученный последовательным разбавлением метиловым спиртом исходного раствора с концентрацией 1 мг/мл, приготовленный согласно разд. 2.6.5.). Затем вносили 6,5 мл ацетонитрила, тщательно перемешивали, центрифугировали в течение 10 мин при 13400 об./мин. Отбирали 1 мл надосадочного слоя и анализировали.

ЖЖЭ. К образцу мочи (5 мл) добавляли 0,05 мл внутреннего стандарта, при проведении ферментативного гидролиза вносили 1 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,5, 0,03 мл раствора бета-глюкуронидазы и инкубировали в течение 80 мин при 55 °С. Затем для осуществления экстракции в кислой среде добавляли 0,05 мл концентрированной соляной кислоты, в щелочной среде – 1 мл карбонатного буферного раствора с рН 10,0. После чего вносили 1 г хлорида натрия и тщательно перемешивали. Экстрагировали 5 мл органического растворителя или смесью растворителей в течение 10 мин на автоматическом экстракторе. Центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин, органический экстракт упаривали досуха в токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток перерастворяли в 0,1 мл подвижной фазы В и анализировали.

ТФЭ. К образцу мочи (5 мл) добавляли 0,05 мл внутреннего стандарта. Кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания через картридж 4 мл метанола и 4 мл воды. Далее загружали 5 мл образца и пропускали со скоростью 1-3 капли/с. Промывку осуществляли 4 мл воды. Патрон сушили под вакуумом в течение 5 мин. Элюировали 4 раза по 1 мл метанола. Элюат упаривали досуха в токе азота, сухой остаток перерастворяли в 0,1 мл подвижной фазы В и анализировали.

Валидацию разработанной методики проводили согласно руководству по валидации биоаналитических методов [183] и методическим

2.7.5 Схема эксперимента по разработке способа обнаружения флавоноидов горянки в растительном сырье и продуктах на его основе

Исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 RS, соединенном с масс-спектрометром Orbitrap Fusion с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения и источником ионизации EASY-Max-NG™.

Масс-спектры получали в условиях ИЭР. Напряжение на капилляре составляло 4,0 кВ; температура капилляра 270°C; температура на распылителе 280°C; скорость потока распыляющего газа (азот) 0,40 л/мин; скорость потока вспомогательного газа (азот) 0,1 л/мин; скорость потока газа-осушителя (азот) 0,05 л/мин. Детектировали в диапазоне масс 100 - 1550 Да при регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов с разрешением 35 000 (на половине высоты) и точностью определения масс 5 м.д. Масс-спектры получали диссоциацией, индуцируемой соударением, в ионной ловушке CID (с использованием гелия марки «6.0» в качестве газа-реагента).

Обработку данных проводили с применением программного обеспечения Xcalibur версии 3.0 (Thermo Scientific, США).

При определении флавоноидов использовали колонку с обращенно-фазовым сорбентом Hypersil Gold aQ, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм, фирмы «Thermo Scientific». Температура колонки составляла 45 °С, объёмная скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 5 : 95 (об.) (А) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (В). Хроматографическое разделение веществ проводили в режиме градиентного элюирования: 0-1 мин — 20% В; 4 мин — 25% В;

4,5 мин — 40% В; 7,5 мин — 95% В; 7,5-10,5 мин — 95% В; 11 мин — 20% В. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 15 мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл.

2.7.6 Получение биоматериала

Экспериментальные исследования проводили с использованием биологической модели белых беспородных крыс-самцов массой 200-350 г с применением обменных камер типа «Metabolic cage for rats» (рис. 6).



Рис. 6. Обменная камера типа «Metabolic cage for rats».

Сбор мочи животных осуществляли с оценкой ее объема. Параллельно испытаниям опытных крыс проводили оценку контрольных особей, получающих вместо исследуемых веществ растворитель, с использованием которого готовили препарат. Контрольные образцы получали при том же пути введения в организм и в те же сроки. Количество животных в группе составляло 5 голов. Для исследований использовали крыс специализированных питомников (ФГУП «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО», Санкт-Петербург), не менее двух недель содержавшихся в карантине в виварии при свободном доступе к воде и специализированному корму типа гранулированного ПК-120 без применения иных кормовых добавок и препаратов.

Животных маркировали и распределяли по группам. Не менее чем за два часа до начала исследований крысам опытной и контрольной групп ограничивали доступ к пище при сохранении свободного доступа к воде.

Перед началом исследования проводили подготовку метаболических камер. Предварительно вымытые с мыльным раствором, промытые затем не менее 10 раз проточной и не менее 3 раз дистиллированной водой и высушенные при комнатной температуре детали подвергали специальной обработке.

Детали камеры, соприкасающиеся с экскрецией животных (сетка поддона камеры, сборная воронка, мочевое кольцо, разделительный конус, кало- и мочеприемник) дополнительно обрабатывали стерильным ватным тампоном, обильно смоченным гексаном марки х.ч. (слитую жидкость собирали в чистые виалы для исследования), а после высыхания – тампоном с избытком раствора 96% этанола (слитую жидкость также подвергали сбору и анализу). При высыхании деталей, камеру собирали и использовали для проведения исследования.

Введение осуществляли внутрижелудочно зондово в виде экстракта *Epimedium Brevicornum* в 50% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 в деионизованной воде в дозе 500 мг/кг (3 мл/кг) [186, 187].

После введения препарата животных немедленно переносили в метаболическую камеру. Им предоставляли свободный доступ к воде при исключении приема пищи.

Отбор проб проводили через 0-12, 12-24, 24-36 часов после введения препарата.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Разработка способа определения флавоноидов горянки методом ВЭЖХ-МС/МС

Поскольку горянка используется в фитомедицине во всем мире, было выполнено большое число работ с целью разработки аналитических методов идентификации, количественного определения и контроля качества растительного сырья, экстрактов и коммерческих продуктов на их основе, в разд. 1.4 приведена информация по некоторым из них. В последние 20 лет наиболее популярными методами определения флавоноидов данных растений стали различные варианты МС детектирования. При этом регистрация в режиме выбранных ионных переходов обладает хорошей чувствительностью и лучшими метрологическими характеристиками. Однако для разработки методик с использованием предложенного способа необходимо наличие СО, так как на первом этапе необходимо оптимизировать условия регистрации масс-спектров для каждого исследуемого соединения. Но при проведении первоначального скрининга растительного сырья и обнаружении минорных флавоноидов использование СО является нецелесообразным в силу их высокой стоимости и труднодоступности. В этом случае оптимальной является групповая идентификация флавоноидов горянки по масс-спектральным и хроматографическим характеристикам. Для этого необходимо изучение особенностей формирования масс-спектров основных компонентов с применением ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения.

3.1.1 Разработка способа идентификации икариина

Масс-спектрометрические характеристики флавоноидов горянки изучали на примере СО икариина путём выявления особенностей фрагментации по масс-спектрам второго порядка.

В нашей работе мы использовали ИЭР молекул аналитов и ХИАД, используемую, как правило, для слабополярных, трудноионизируемых соединений. Для сравнения на рис. 7 приведены масс-спектры раствора икариина с концентрацией 10 мкг/мл, полученные нами при ХИАД и при ИЭР. Из-за более высокой интенсивности сигналов в области молекулярного иона и высокого отношения сигнала к шуму, выбрали ИЭР.

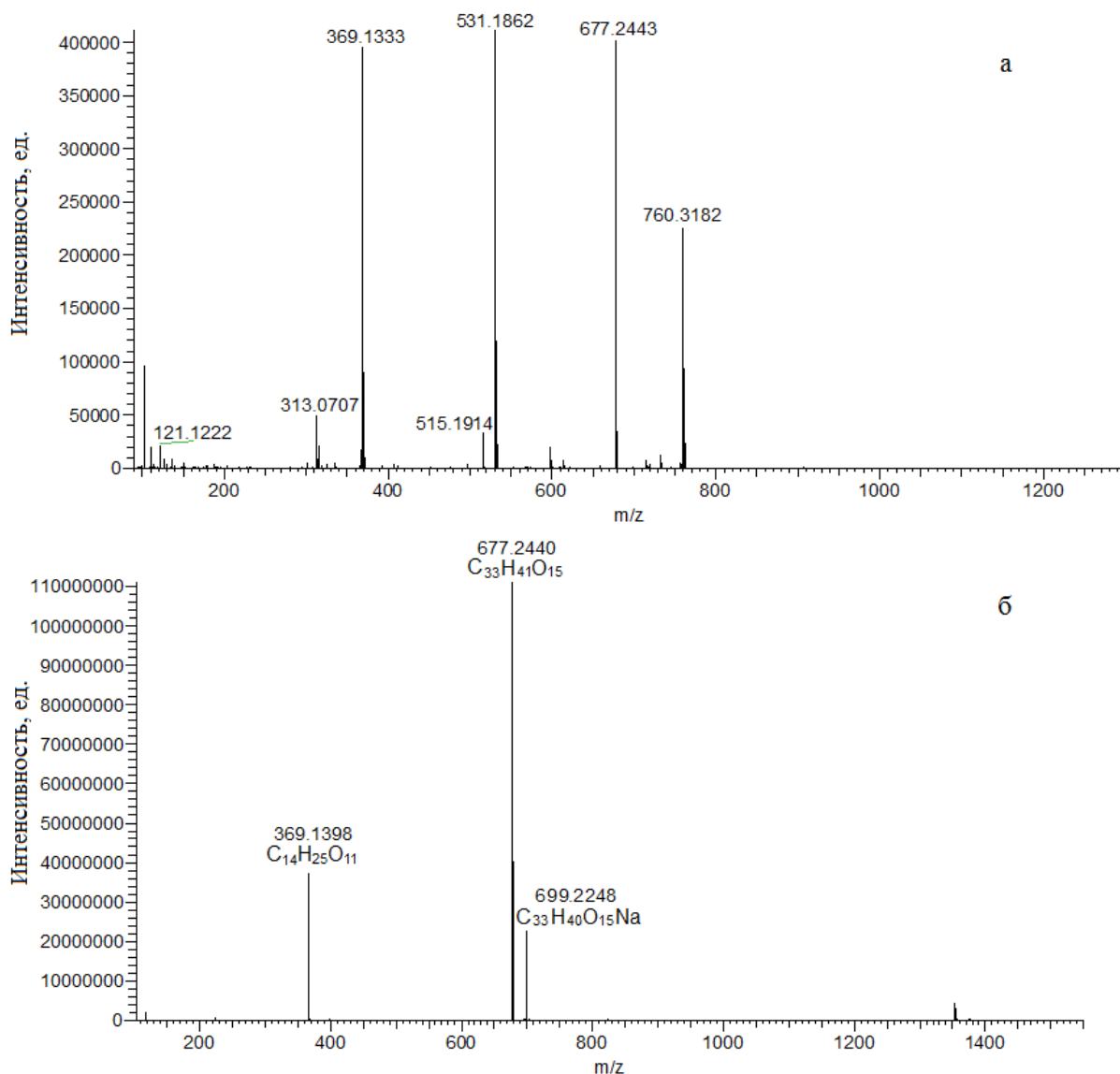


Рис. 7. Масс-спектры пика, соответствующего икариину с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле, в режиме регистрации положительно заряженных ионов при ХИАД (а) и при ИЭР (б).

По литературным данным известно, что при использовании ИЭР икариин детектируется в условиях регистрации положительно [133] и отрицательно заряженных ионов [137]. Поэтому на первом этапе исследование детектирование осуществляли при двух режимах ионизации с

применением масс-спектрометрии высокого разрешения. Это позволило определить точные массы ионов, соответствующие моноизотопным массам протонированных молекул икариина. В режиме регистрации положительно заряженных ионов икариин образует протонированную молекулу $[M+H]^+$ с m/z 677,2433 с двумя изотопными пиками с m/z 678,2469 и 679,2496 (рис. 8а). Ион аддукта с m/z 699,2248, $C_{33}H_{40}NaO_{15}$ и фрагментный ион 369,1398, $C_{14}H_{25}O_{11}$ соответствуют присоединению натрия и отщеплению остатков глюкозы и рамнозы, соответственно. В условиях ИЭР с регистрацией отрицательно заряженных ионов образуется ион $[M-H]^-$ с m/z 675,2288 с изотопными пиками с m/z 676,2314 и 677,2344 (рис. 8б).

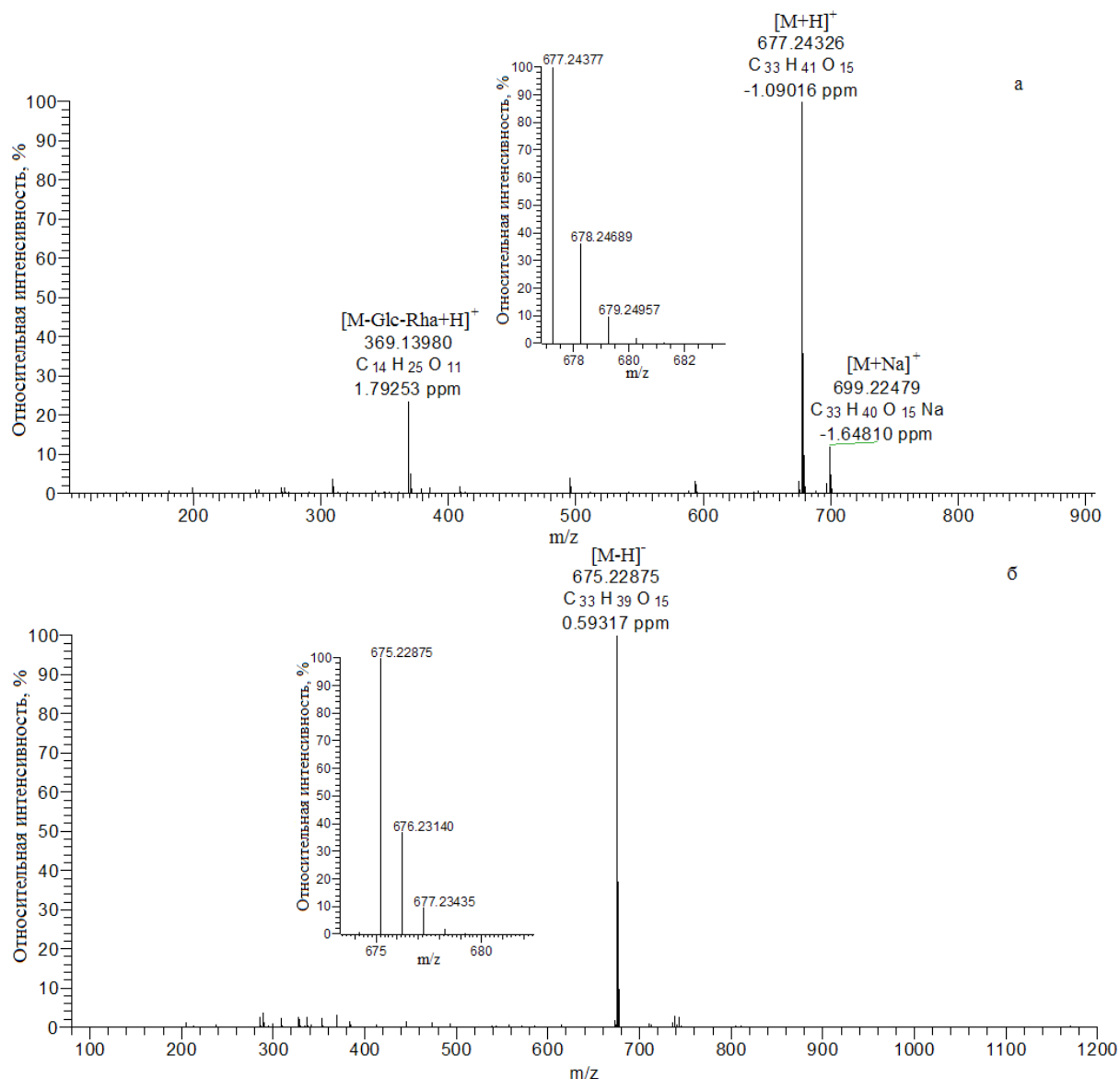


Рис. 8. Масс-спектры пика, соответствующего икариину, в условиях регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов (Glc – глюкоза, Rha – рамноза).

В масс-спектре икариина при использовании ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов максимальную интенсивность имеет ион с m/z 677,2433, а отрицательно заряженных ионов - с m/z 675,2288.

Изучение диссоциации ионов-предшественников в тандемной масс-спектрометрии является необходимым этапом работы, так как без этого невозможен поиск и правильный выбор характеристичных ионов, используемых при регистрации селективных реакций для идентификации целевых соединений в режиме МС/МС.

Полученные на первом этапе исследования ионы с максимальной интенсивностью использовали в качестве ионов-предшественников. Спектры МС/МС получали варьируя энергии соударительной диссоциации в диапазоне 10-70 В с шагом в 10 В (табл. 10).

Таблица 10 – МС/МС-спектры икариина, полученные в режимах регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов

Энергия столкновений, В	m/z ($I_{\text{отн}}$, %)	
	Режим регистрации положительно заряженных ионов	Режим регистрации отрицательно заряженных ионов
10	369,1330 (100)	675,2288 (100)
20	369,1330 (100)	675,2288 (100), 367,1185 (60)
30	369,1330 (100), 313,0703 (25)	675,2288 (30), 367,1185 (100)
40	369,1330 (35), 313,0703 (100)	367,1185 (90), 352,0952 (100), 323,0925 (36)
50	313,0703 (100)	367,1185 (20), 352,0952 (100), 323,0925 (80)
60	313,0703 (100), 243,0649 (8), 187,0752 (6), 135,0440 (10), 97,0288 (14)	352,0952 (80), 323,0925 (100), 308,0328 (34), 295,0973 (28), 281,0456 (34), 267,0298 (44), 255,0298 (18)
70	313,0703 (100), 243,0649 (34), 187,0752 (46), 135,0440 (76), 97,0288 (42)	352,0952 (20), 323,0925 (94), 308,0328 (36), 295,0973 (48), 281,0456 (98), 267,0298 (100), 255,0298 (38)

Для подтверждения структуры и рассмотрения возможных фрагментных ионов экспериментальные результаты сопоставляли с расчётными, полученными с помощью программы HighChem Mass Frontier версии 7.0. Наиболее вероятными из представленных структур являются

фрагментные ионы с наименьшей энергией образования [188], которую вычисляли с помощью полуэмпирического квантово-химического метода AM1 при использовании программы HyperChem версии 7. Данный метод является одним из наиболее точных и используется для больших органических молекул, содержащих ароматические кольца и кислород. Результаты представлены в табл. А1. Расчётные и экспериментальные значения m/z отличаются менее чем на 5 м.д.

Для определения оптимальных параметров при идентификации икариина выбрали характеристичные фрагментные ионы с максимальной интенсивностью в МС/МС-спектрах и построили кривые зависимостей площадей пиков ионов от энергии фрагментации как в условиях регистрации положительно (рис. 9а), так и отрицательно заряженных ионов (рис. 9б). Согласно представленным кривым, максимальные площади пиков ионов с m/z 313,0703 и 369,1330 в условиях регистрации положительно заряженных ионов и с m/z 352,0952, 367,1185, 323,0925 в условиях регистрации отрицательно заряженных ионов достигаются при 40 В.

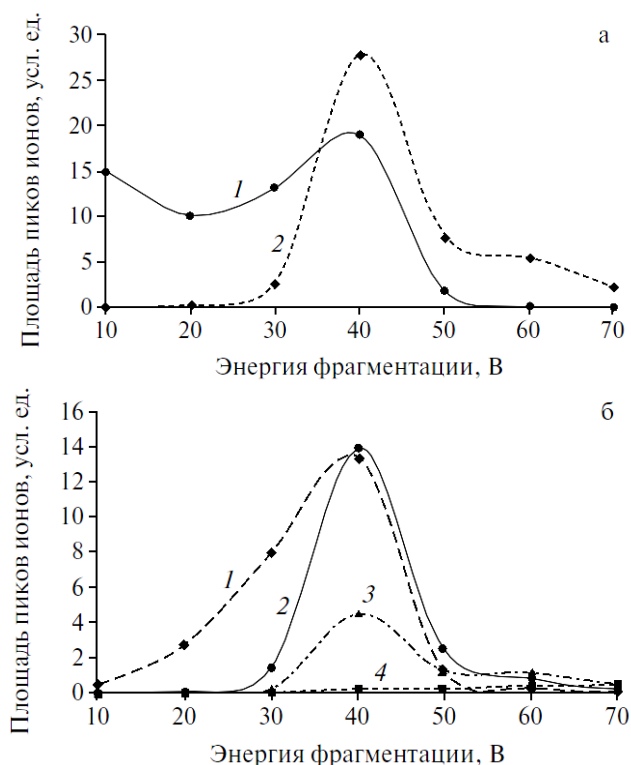


Рис. 9. Кривые оптимизации энергии фрагментации: а – в режиме регистрации положительно заряженных ионов: 1 – 677 → 369; 2 – 677 → 313; б – в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов: 1 – 675 → 367; 2 – 675 → 352; 3 – 675 → 323; 4 – 675 → 267.

Таким образом, следующие условия и параметры являются оптимальными при идентификации икариина:

в режиме регистрации положительно заряженных ионов – ионный переход с m/z 677,2433 \rightarrow 313,0703, 369,1330, энергия соударений – 40 В (рис. 10а);

в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов – ионный переход с m/z 675,2288 \rightarrow 352,0952, 367,1185, 323,0925, энергия соударений – 40 В (рис. 10б).

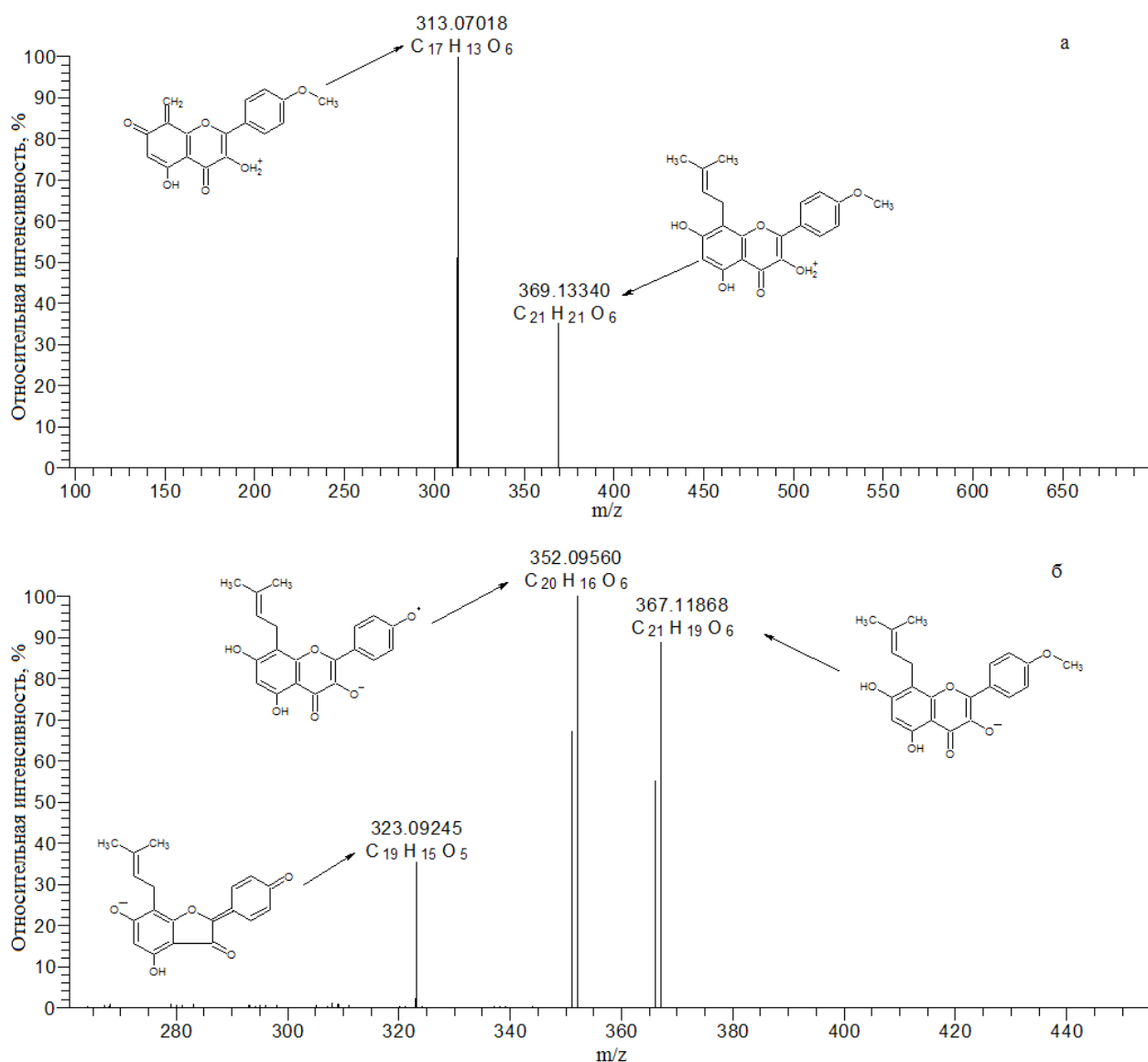


Рис. 10. МС/МС-спектры пика, соответствующего икариину, в режиме регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В.

3.1.2 Разработка способа количественного определения флавоноидов горянки в режиме регистрации выбранных ионных переходов

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования. Как было выяснено ранее (разд. 3.1.1) флавоноиды горянки при ИЭР образуют протонированные и депротонированные молекулы, однако интенсивность первых выше, что можно наблюдать на рис. 11, где для сравнения представлены масс-спектры икаризида II, полученные при двух режимах ионизации.

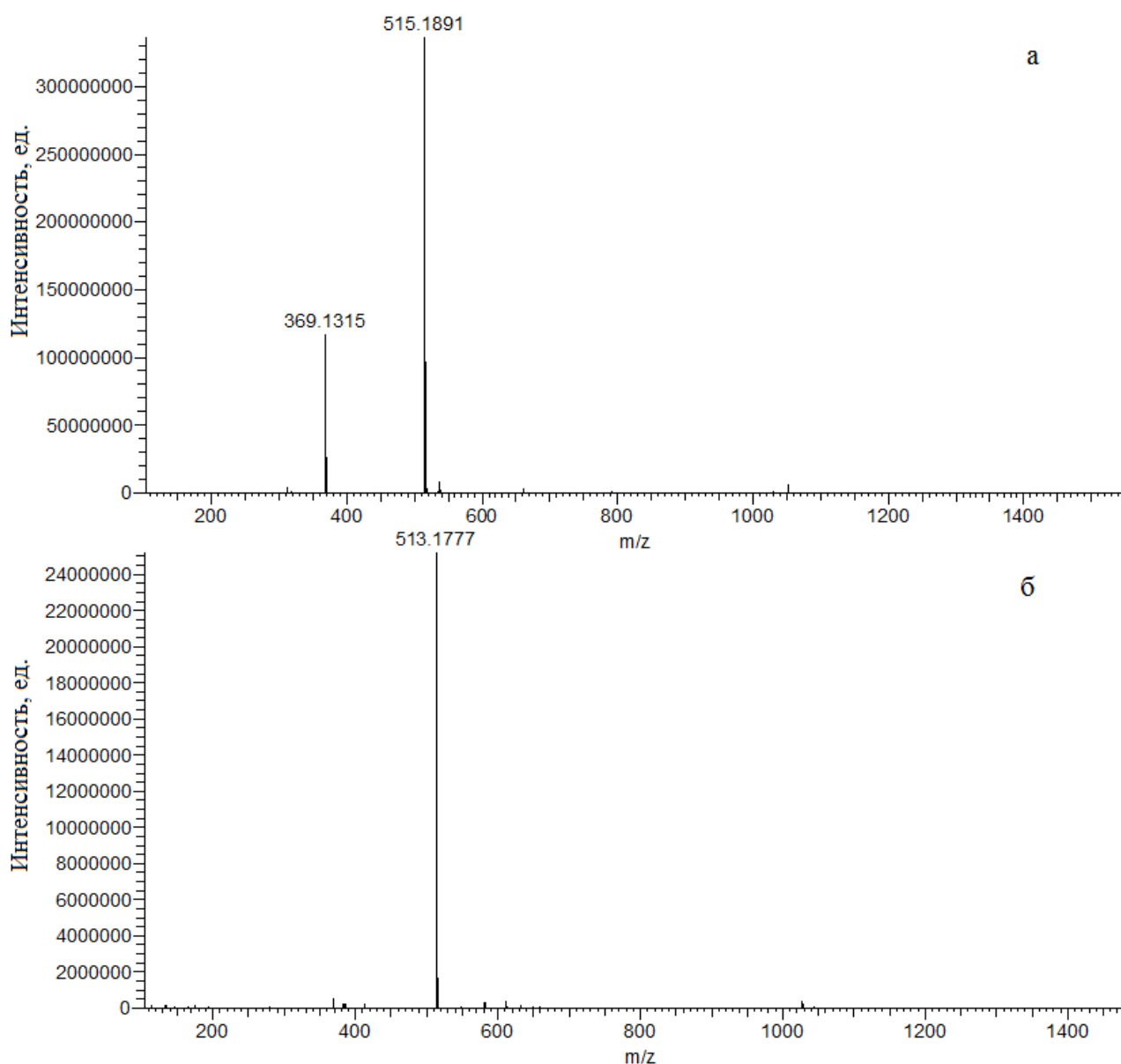


Рис. 11. Масс-спектры пика, соответствующего икаризиду II в метаноле с концентрацией 10 мкг/мл, в условиях регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов.

Поэтому необходимо рассмотреть целесообразность применения режима регистрации положительно заряженных ионов на примере других флавоноидов, приведённых в табл. 9. В полученных масс-спектрах данных веществ присутствовали сигналы, соответствующие протонированным молекулам с m/z 369,1333 для икаритина, 531,1861 для икаризида I, 515,1912 для икаризида II, 839,2968 для эпимедина А и 809,2863 для эпимедина В, что проиллюстрировано на рис. 12 и 13.

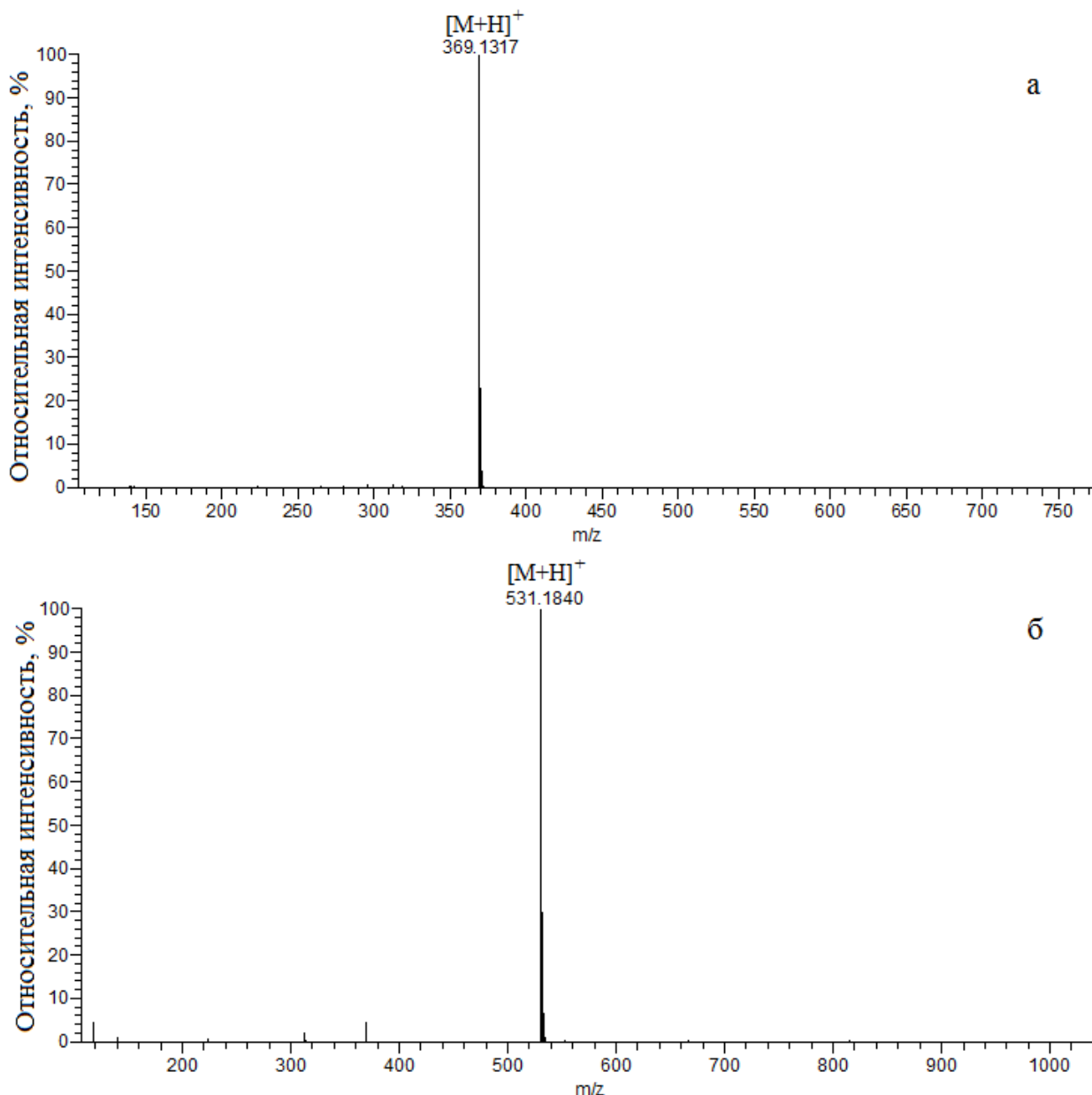


Рис. 12. Масс-спектры в условиях регистрации положительно заряженных ионов пиков, соответствующих икаритину (а) и икаризиду I (б) в метаноле с концентрацией 10 мкг/мл.

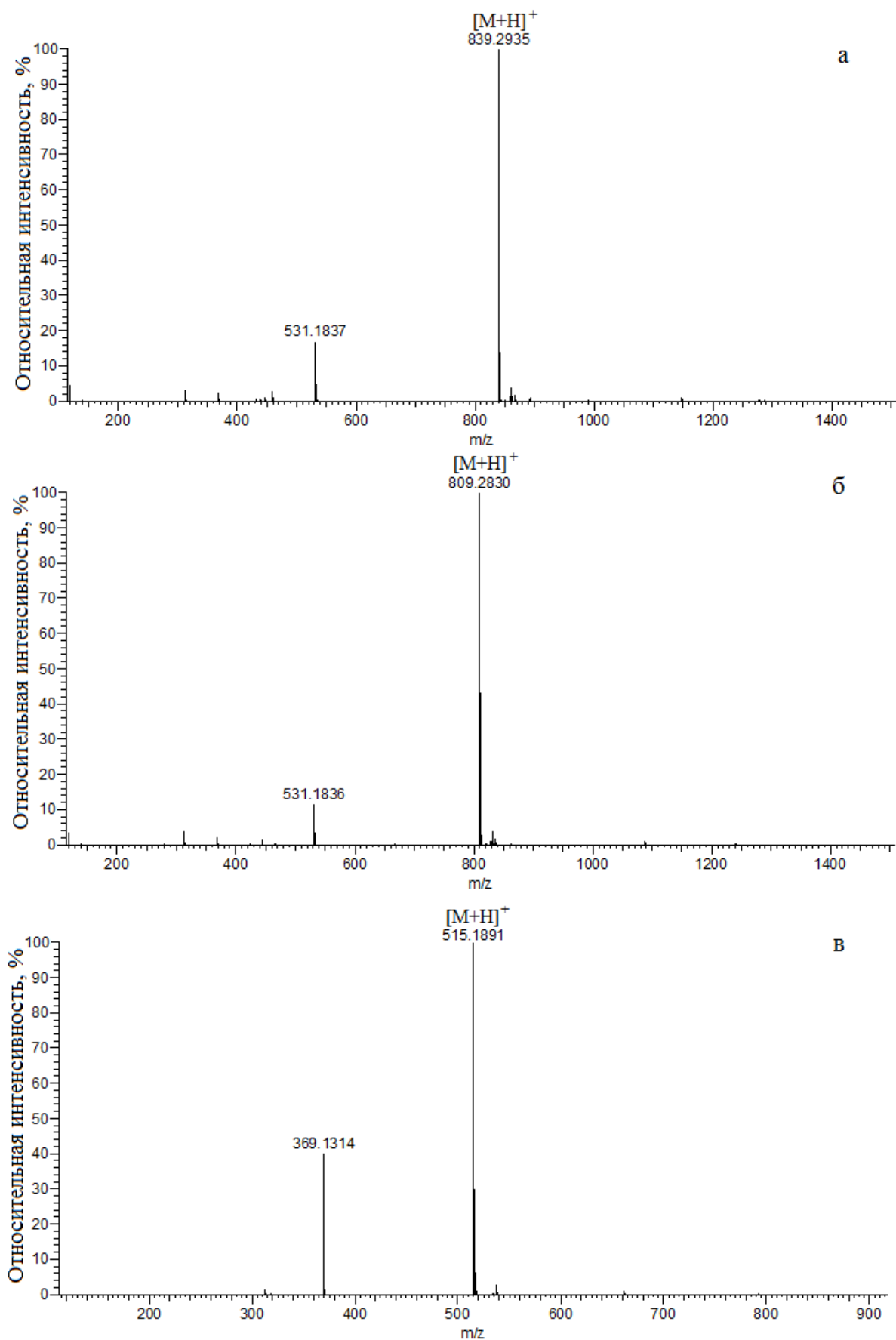


Рис. 13. Масс-спектры в условиях регистрации положительно заряженных ионов пиков, соответствующих эпимедину А(а), эпимедину В (б) и икаризиду II (в) в метаноле с концентрацией 10 мкг/мл.

Данные ионы могут быть успешно использованы в качестве предшественников для определения аналитов в режиме мониторинга заданных реакций.

На стадии оптимизации условий тандемного масс-спектрометрического детектирования проводили выбор оптимальных пар ионных переходов и энергий соударений. Для этого исследовали влияние энергии фрагментации в камере соударений масс-спектрометра на характер спектра фрагментных ионов, образующихся при распаде протонированных молекулярных ионов определяемых флавоноидов, и на интенсивность образующихся ионов-продуктов.

Таким образом, для получения максимального аналитического сигнала для определяемых флавоноидов в режиме регистрации положительно заряженных ионов необходимо использовать параметры работы масс-спектрометра, приведённые в табл. 11.

Таблица 11 – Оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования определяемых флавоноидов в режиме регистрации положительно заряженных ионов

Определяемое вещество	Ион-предшественник $[M+H]^+$, Да	Брутто-формула иона-предшественника	Энергия столкновений, В	Фрагментные ионы, Да (отн. интенсивность, %)	Брутто-формулы ионов-продуктов
Эпимедин А	839,2968	$C_{39}H_{51}O_{20}$	30	369,1333 (100) 313,0707 (15)	$C_{21}H_{21}O_6$ $C_{17}H_{13}O_6$
Эпимедин В	809,2863	$C_{38}H_{49}O_{19}$	30	369,1333 (100) 313,0707 (15)	$C_{21}H_{21}O_6$ $C_{17}H_{13}O_6$
Икаризид I	531,1861	$C_{27}H_{31}O_{11}$	40	369,1333 (55) 313,0707 (100)	$C_{21}H_{21}O_6$ $C_{17}H_{13}O_6$
Икаризид II	515,1912	$C_{27}H_{31}O_{10}$	40	369,1333 (55) 313,0707 (100)	$C_{21}H_{21}O_6$ $C_{17}H_{13}O_6$
Икариин	677,2440	$C_{33}H_{41}O_{15}$	40	369,1333 (35) 313,0707 (100)	$C_{21}H_{21}O_6$ $C_{17}H_{13}O_6$
Икаритин	369,1333	$C_{21}H_{21}O_6$	50	313,0707 (100) 243,0652 (15)	$C_{17}H_{13}O_6$ $C_{14}H_{11}O_4$

Из данных табл. 11 видно, что для всех исследуемых компонентов наблюдается определённое сходство путей фрагментации в ячейке

соударений (рис. 10а, 14, 15). Рассчитанные на основании точной массы брутто-формулы ионов-продуктов соответствуют предполагаемым структурам фрагментных ионов, представленных нами ранее (разд. 3.1.1). Ионы-продукты с m/z 531,1861 и 369,1333 образуются в результате последовательной потери углеводных остатков. Можно предположить, что перегруппировка изопентеновой группы в положении 8 в А-кольце приводит к образованию фрагментного иона с m/z 313,0707 (табл. А1). Кроме того, разрыв связи углерод метильной группы – кислород в положении 4' и перегруппировка В-кольца с отрывом СО приводит к образованию иона с m/z 243,0652 (разд. 3.1.1).

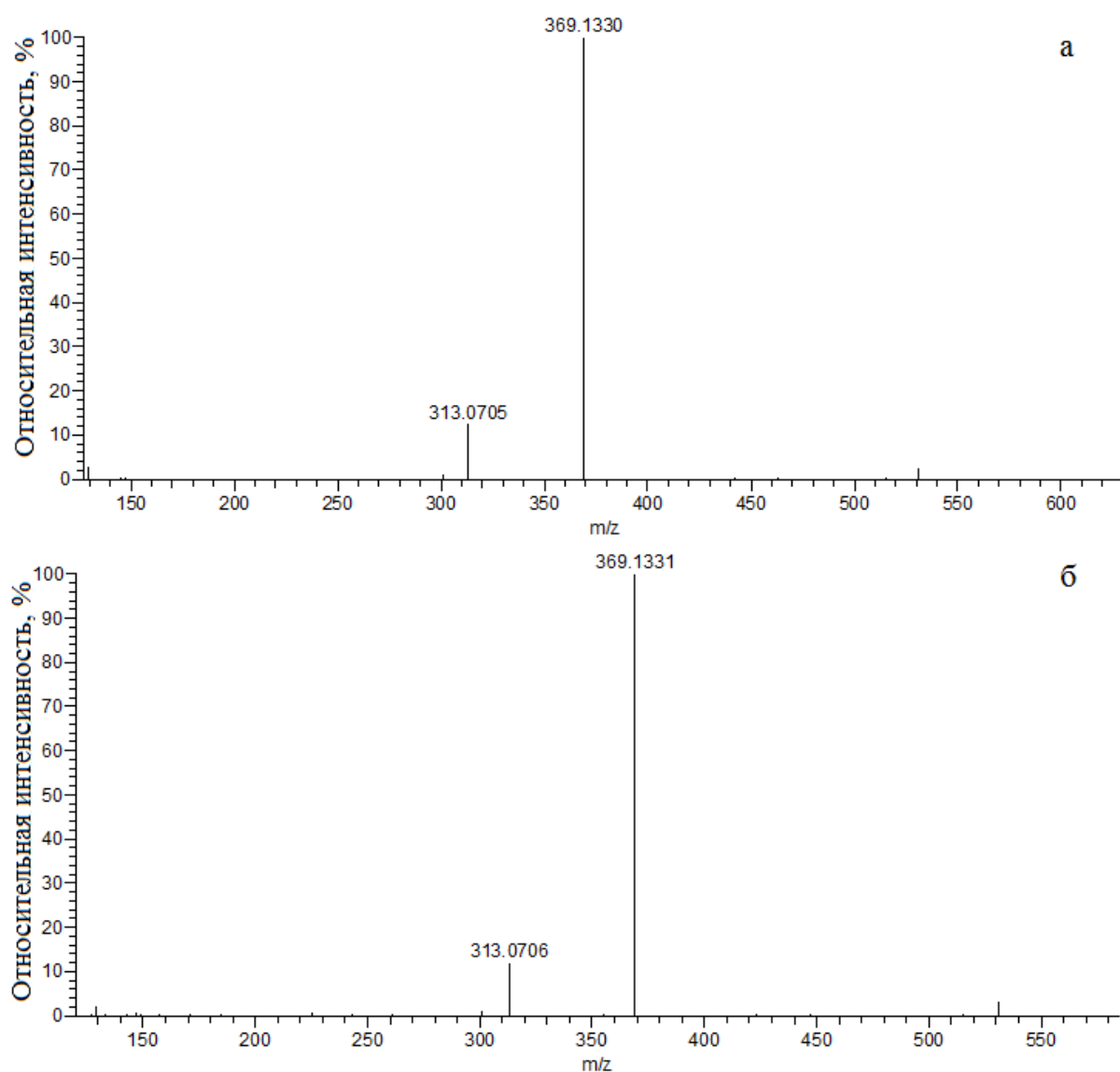


Рис. 14. МС/МС-спектры пиков, соответствующих эпимедину А (а) и эпимедину В (б), в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации - 30 В.

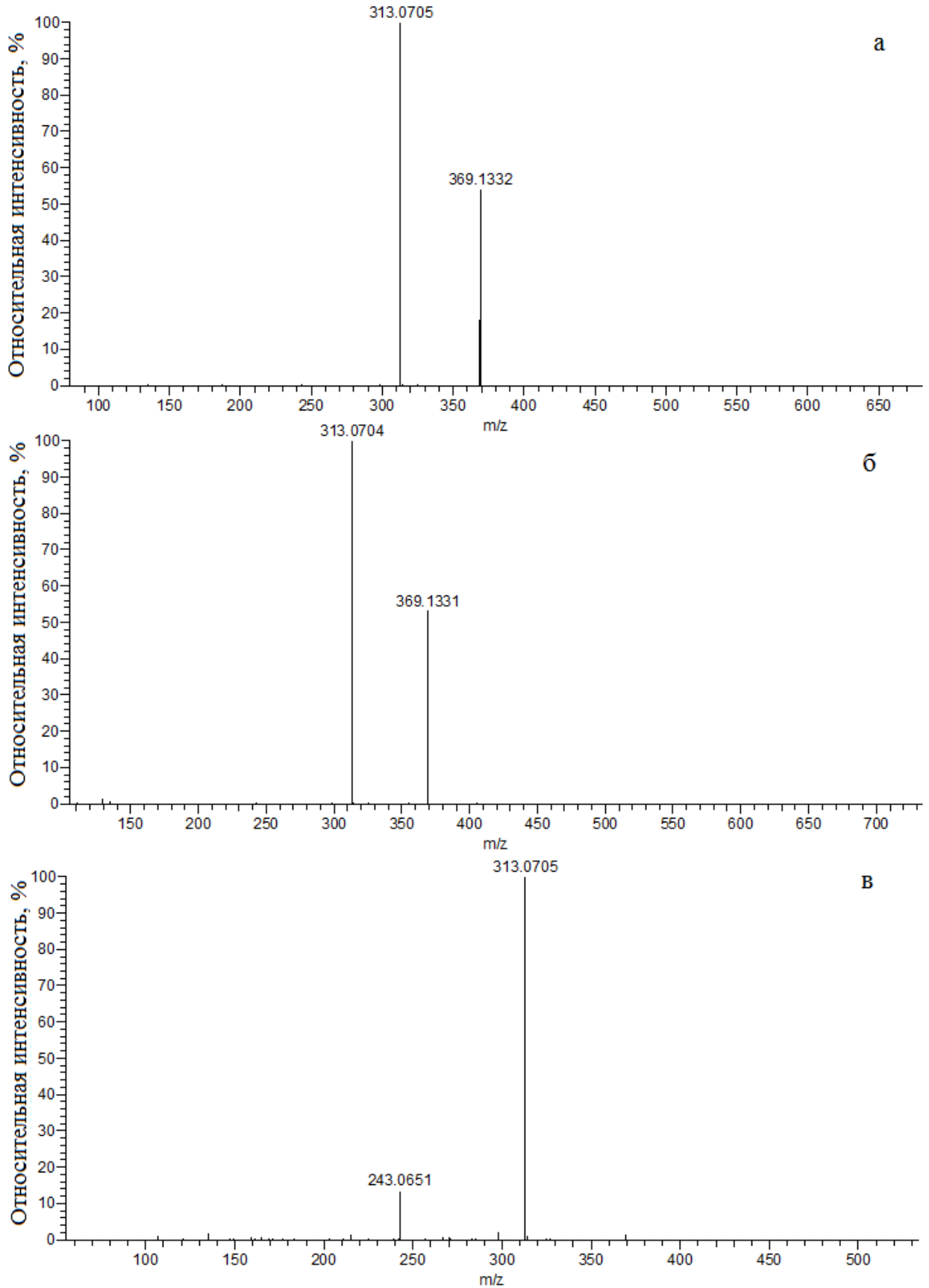


Рис. 15. МС/МС-спектры пиков, соответствующим икаризиду I (а), икаризиду II (б) и икаритину (в), в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации – 40 В, 40 В и 50 В, соответственно.

Выбор условий хроматографического определения. Тандемное МС детектирование позволяет обойтись без полного хроматографического разделения всех исследуемых компонентов, однако использование такого приводит к повышению достоверности обнаружения аналитов. Хроматографическое разделение осуществляли в режиме обращенно-фазового градиентного элюирования. В качестве элюентов были выбраны 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 5 : 95 (об.) (элюент А) и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Использование подвижных фаз с рН, соответствующим слабокислоте раствору, позволило повысить чувствительность масс-спектрометрического детектирования за счёт увеличения доли заряженной формы определяемых веществ в электроосреде. В качестве неподвижной фазы, используемой для хроматографического разделения, применяли сорбент на основе силикагеля, модифицированный группами С18 (Hypersil Gold aQ) с полярными функциональными группами, обеспечивающими дополнительный механизм взаимодействия для разделения полярных соединений. Применяли четыре колонки, заполненные данным сорбентом, размерами 150×2,1 мм (диаметром зерна сорбента 1,9 мкм и 3 мкм), 100×2,1 мм (1,9 и 3 мкм). Также на данном этапе работы параллельно варьировали программу градиентного элюирования для достижения максимальных чувствительности, эффективности и оптимального коэффициента емкости (от 1 до 5). Приемлемых времён удерживания определяемых веществ и их полного разделения удалось достигнуть при использовании колонки 150×2,1 мм с диаметром зерна сорбента 3 мкм и программой градиентного элюирования, представленной на рис. 16. При этом, чем больше в структуре соединений гликозидных остатков, тем меньше у них время выхода.

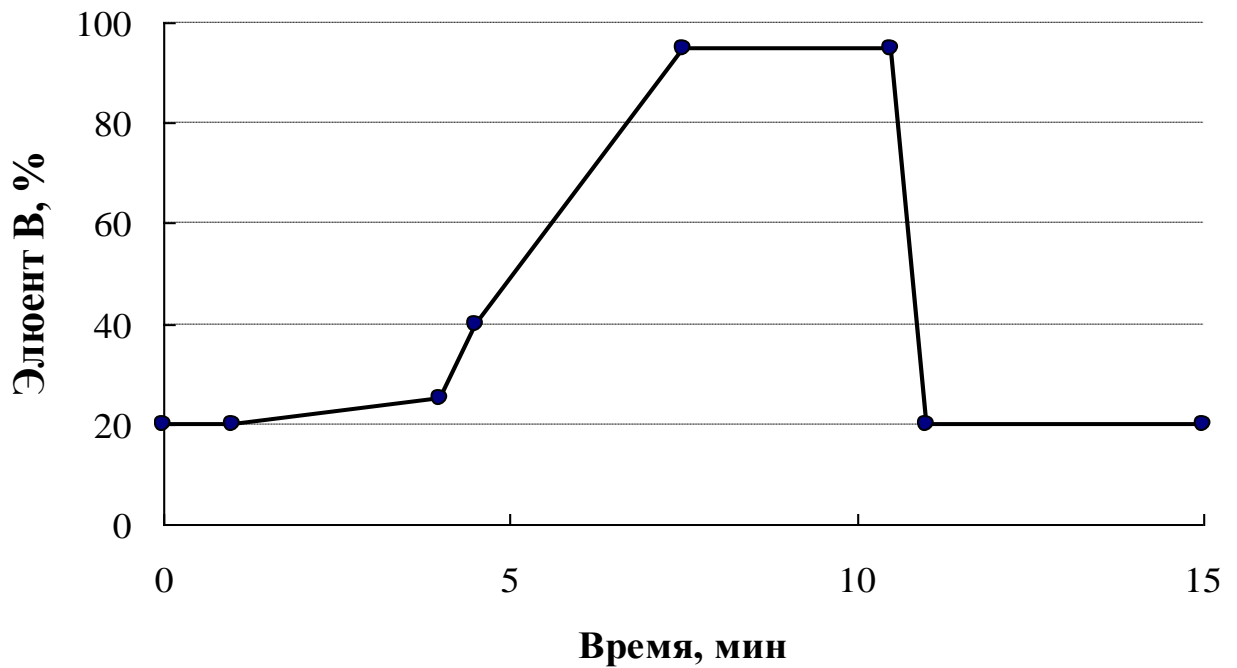


Рис. 16. Программа градиентного элюирования.

На рис. 17 представлены хроматограммы стандартного раствора, содержащего 6 флавоноидов (рис. 17а), и растительного экстракта (рис. 17б).

Параметры хроматографического разделения аналитов приведены в табл. 12 (при расчётах использовали величину мёртвого времени, равного 0,7 мин).

Таблица 12 – Параметры хроматографического разделения икариина, икаритина, эпимединов А, В и икаризидов I, II на колонке Hypersil Gold aQ (150 × 2,1 мм, размер зерна сорбента 3 мкм) при скорости потока 0,6 мл/мин

Вещество	Время удерживания, мин	Разрешение пиков	Коэффициент селективности
Эпимедин А	3,67	1,6	1,1
Эпимедин В	3,93	2,1	1,1
Икариин	4,41	10,9	1,4
Икаризид I	5,87	4,5	1,1
Икаризид II	6,01	6,2	1,2
Икаритин	6,99	-	-

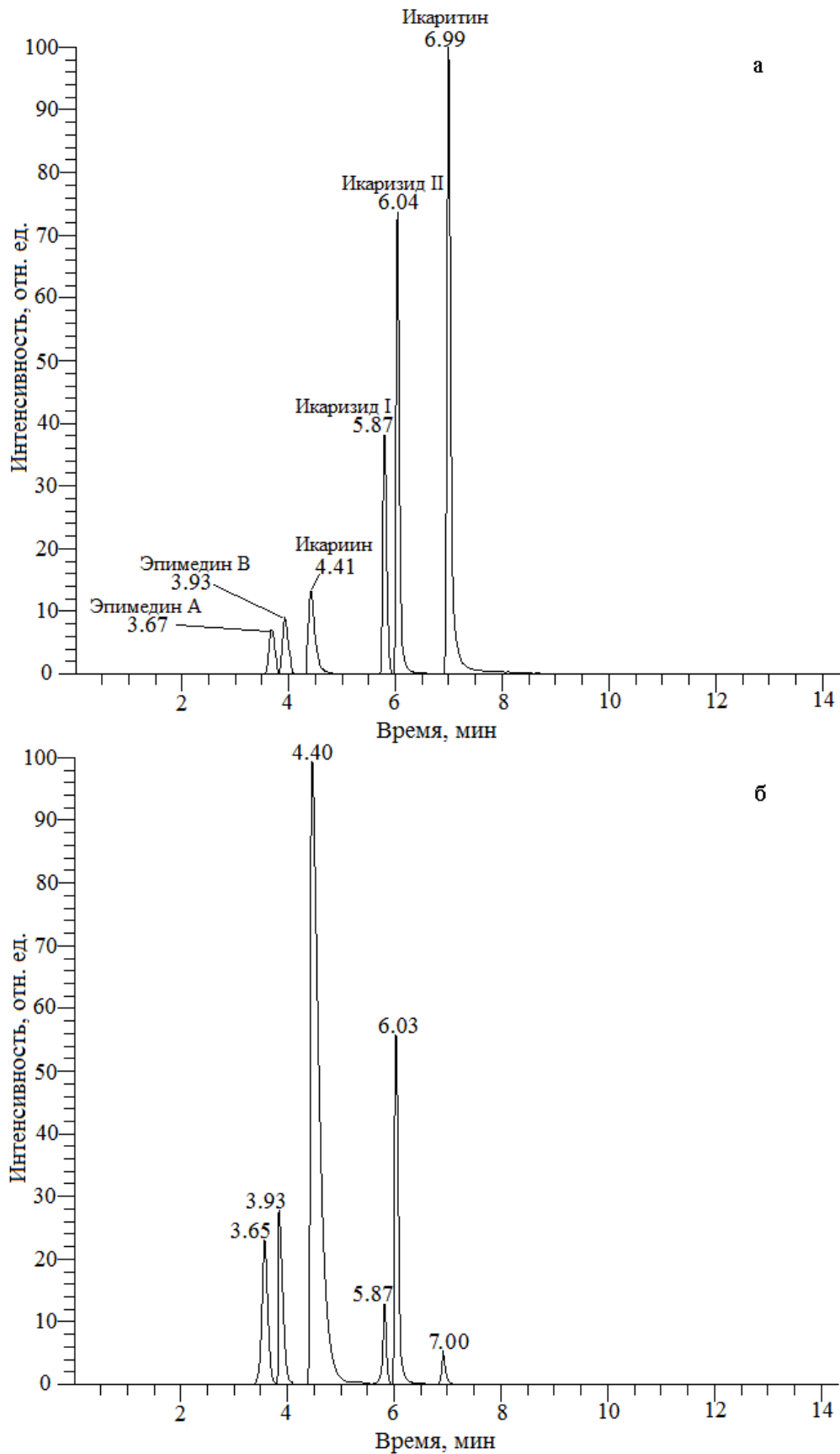


Рис. 17. Хроматограммы в режиме сканирования по выбранным ионным переходам: а – стандартного раствора, содержащего 0,1 мкг/мл икариина, икаритина, эпимединов А, В и икаризидов I, II; б - этанольного экстракта из настойки на основе корейской горянки (*Epimedium koreanum*).

Апробация на реальных объектах. Для апробации разработанного способа определения флавоноидов были проанализированы 3 препарата на основе горянки.

1. Экстракт горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*) – порошок горчичного цвета (Прикладная биотехнология, Россия).

2. Гранулированный чай с экстрактом горянки корейской (*Epimedium koreanum*) – представляет собой измельченные сухие листья, расфасованные в фильтр-пакеты (Государственная Корпорация Здравоохранения «Маннён», Северная Корея).

3. Настойка из горянки корейской, представляющая собой вязкую жидкость тёмно-коричневого цвета (Государственная Корпорация Здравоохранения «Маннён», Северная Корея).

Экстракцию проводили 70%-ным раствором этанола в воде (согласно разд. 2.7.2). В качестве примера, на рис. 17б приведена хроматограмма в режиме сканирования по выбранным ионным переходам этанольного экстракта из настойки на основе корейской горянки. Содержание флавоноидов в исследованных образцах приведено в табл. 13. Расчёт содержаний аналитов проводили согласно построенным уравнениям градуировочной зависимости (табл. 14) с использованием растворов, приготовленных согласно разд. 2.6.6.

Предложенный нами способ определения флавоноидов горянки методом ВЭЖХ-МС/МС отличается хорошей селективностью по отношению к основным компонентам горянки, и низкими пределами обнаружения по сравнению с используемыми ранее методами [37, 38]. В результате проведённых исследований удалось сократить время хроматографического анализа с 40 [56] до 15 мин. Данный способ обладает широким диапазоном линейности градуировочного графика и может применяться для количественного анализа как растительных экстрактов, так и фитопродуктов и лекарственных средств на основе горянки, а также для контроля качества коммерческих продуктов.

Таблица 13 – Содержания флавоноидов, определённые в режиме сканирования по выбранным ионным переходам, в образцах экстракта *Epimedium brevicornum*, чая с экстрактом *Epimedium koreanum* и настойки из *Epimedium koreanum* (N=3, P=0,95)

№ п/п	Образец	Содержание, мг/г					
		Эпимедин А	Эпимедин В	Икариин	Икаризид I	Икаризид II	Икаритин
1	Экстракт <i>Epimedium brevicornum</i>	28±2	40±4	153±10	2,6±0,3	31±3	1,0±0,1
2	Чай с <i>Epimedium koreanum</i>	(12,1±0,6) ×10 ⁻²	(16,6±0,2) ×10 ⁻²	(7,0±0,6) ×10 ⁻¹	(1,2±0,1) ×10 ⁻²	(2,3±0,2) ×10 ⁻²	(6,2±0,2) ×10 ⁻⁴
3	Настойка из <i>Epimedium koreanum</i>	2,7±0,2	3,6±0,5	10,1±0,2	(1,1±0,1) ×10 ⁻¹	(6,8±0,8) ×10 ⁻¹	(11,8±0,8) ×10 ⁻³

Таблица 14 – Метрологические характеристики разработанной методики определения флавоноидов горянки методом ВЭЖХ-МС

Вещество	Диапазон линейности градуировочного графика, мкг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	S _r , %	Предел обнаружения в водном растворе, мкг/мл
Эпимедин А	0,001-25	$y=2,2 \times 10^4 x + 2,7 \times 10^6$	9	0,0005
Эпимедин В	0,001-25	$y=2,1 \times 10^4 x + 3,0 \times 10^6$	8	0,0005
Икариин	0,002-25	$y=4,4 \times 10^4 x + 9,2 \times 10^6$	10	0,0007
Икаризид I	0,001-10	$y=5,1 \times 10^4 x + 1,9 \times 10^7$	11	0,0005
Икаризид II	0,001-10	$y=6,3 \times 10^4 x + 4,7 \times 10^7$	12	0,0005
Икаритин	0,003-25	$y=1,0 \times 10^5 x + 2,0 \times 10^7$	10	0,0009

На основании полученных результатов разработана, аттестована и внесена в реестр аттестованных методик измерения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии «Росстандарт» методика измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных

добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии под №6.00163/2-28-2016 от 28.03.16 (Приложение Б), что подтверждается свидетельством об аттестации, приведённом на рис. А1 Приложения. Предложенный способ определения флавоноидов горянки используется в ФГУП «НЦ «Сигнал», что подтверждается актом внедрения, приведённым на рис. А2 Приложения.

3.2 Разработка способа группового обнаружения флавоноидов горянки

Идентификация основных компонентов горянки и поиск их новых производных в растительном сырье являются важными задачами. Многие методы идентификации и установления структуры соединений в сложных многокомпонентных матрицах основываются на индивидуальном выделении компонента и анализе его с помощью ЯМР-спектрометрии [189-201], позволяющей установить структуру аналитов по совокупности ^1H и ^{13}C -спектров. Такой процесс в отличие от метода ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения трудоемок и длителен, так как требует предварительного препаративного разделения компонентов по фракциям и концентрирования исследуемых соединений при малом их содержании в экстракте.

Для идентификации флавоноидов горянки в матрице растительного экстракта методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения необходимо детальное изучение фрагментации данных соединений, а также определение характеристичных фрагментных ионов, позволяющих подтверждать принадлежность неизвестных соединений к классу флавоноидов горянки при отсутствии полного комплекта стандартных образцов. Данный метод позволяет получать значения масс анализируемых веществ с точностью до 5 м.д., что делает обнаружение целевых аналитов более селективным [202].

Современный tandemный масс-спектрометр позволяет исследовать структурные особенности на основании масс-спектров, получаемых за счёт различных типов фрагментации, без предварительного выделения индивидуальных соединений. Одним из используемых типов фрагментации является CID («collision induced dissociation» - «диссоциация, индуцируемая соударениями») в ионной ловушке при заданной варьируемой энергии столкновений.

На начальном этапе работы (разд. 3.1.1-3.1.2) получены масс-спектры высокого разрешения для имеющихся в наличии стандартов: икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов A, B. В режиме регистрации отрицательно заряженных ионов образуются депротонированные молекулы аддукта икариина, икаризида I, эпимединов A, B с муравьиной кислотой (компонентом подвижной фазы) $[M+HCOOH-H]^-$ и депротонированные молекулы $[M-H]^-$ икаритина и икаризида II. Масс-спектры первого порядка имеющихся стандартов в условиях регистрации положительно заряженных ионов содержат интенсивный ион $[M+H]^+$. Согласно результатам предварительных экспериментов, в режиме регистрации положительно заряженных ионов чувствительность определения соединений выше, а масс-спектры –интенсивнее, чем в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Поэтому в дальнейшей работе использовали только первый из указанных режимов.

Следующий этап заключался в получении MS^n -спектров (где $n = 2 - 4$) и выявлении особенностей фрагментации икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов A, B. Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования представлены в разд. 2.7.2. Исследования проводили с помощью диссоциации, индуцируемой соударением. Фрагментация с использованием данного режима в настоящее время является наиболее широко используемой в tandemной масс-спектрометрии. Ионная диссоциация протонированных молекул происходит в линейной ионной ловушке благодаря столкновению с молекулами

инертного газа – гелия [203]. Этот метод является эффективным для фрагментации большинства «малых» молекул, в том числе флавоноидов горянки. Проводя исследования при энергии соударений в диапазоне 10-50 В с шагом 10 В, выбрали энергию 20 В, при которой наблюдается появление первых ион-продуктов. Происходит отщепление углеводных заместителей (табл. 15): рамнозного – у икариина (с образованием иона с m/z 531,1861) и икаризида II (m/z 369,1333), глюкозного – у икаризида I (m/z 369,1333) и эпимедина А (m/z 677,2440), ксилозного – у эпимедина В (m/z 677,2440). При дальнейшей фрагментации наблюдается последовательное отщепление углеводных заместителей, при этом сначала происходит потеря углеводных групп в положении С3, затем в положении С7 с образованием ион-продукта с m/z 369,1333, а перегруппировка изопентеновой группы в положении С8 приводит к появлению ион-продукта с m/z 313,0707. Таким образом, m/z 369,1333 и 313,0707 являются характеристичными массами при обнаружении неизвестных флавоноидов горянки и их отнесении к данному классу соединений, так как соответствуют фрагментам, общим для действующих соединений растений рода *Epimedium*. На основании предполагаемых структур характеристичных фрагментных ионов, представленных нами ранее с помощью программ HighChem Mass Frontier и HyperChem (табл. А1), на рис. 18 изображена предположительная схема фрагментации флавоноидов горянки.

Таблица 15 – Характеристичные фрагментные ионы флавоноидов горянки в МСⁿ-спектрах, полученных в условиях диссоциации, индуцируемой соударением

Соединение		МС	МС ²	МС ³	МС ⁴
[ион-предшественник]: <i>m/z</i> (I _{отн} %)	Икариин	677,2440 (100)	[677,2440]: 531,1861 (100), 677,2440 (30), 369,1333 (10)	[677,2440→531,1861]: 369,1333 (100), 313,0707 (10)	-
	Икаритин	369,1333 (100), 313,0707 (5)	[369,1333]: 313,0707 (100), 369,1333 (55)	-	-
	Икаризид I	531,1861 (100)	[531,1861]: 369,1333 (100) 313,0707 (10)	-	-
	Икаризид II	515,1912 (100), 369,1333 (40)	[515,1912]: 369,1333 (100) 313,0707 (10)	-	-
	Эпимедин А	839,2968 (100)	[839,2968]: 677,2440 (100), 531,1861 (70), 839,2968 (20)	[839,2968→677,2440]: 531,1861 (100), 677,2440 (30), 369,1333 (10), 839,2968 (3)	[839,2968→677,2440→531,1861]: 369,1333 (100) 313,0707 (10)
	Эпимедин В	809,2863 (100)	[809,2863]: 677,2440 (100), 531,1861 (50), 809,2863 (40)	[809,2863→677,2440]: 531,1861 (100), 677,2440 (30), 369,1333 (10), 809,2863 (5)	[809,2863→677,2440→531,1861]: 369,1333 (100) 313,0707 (10)

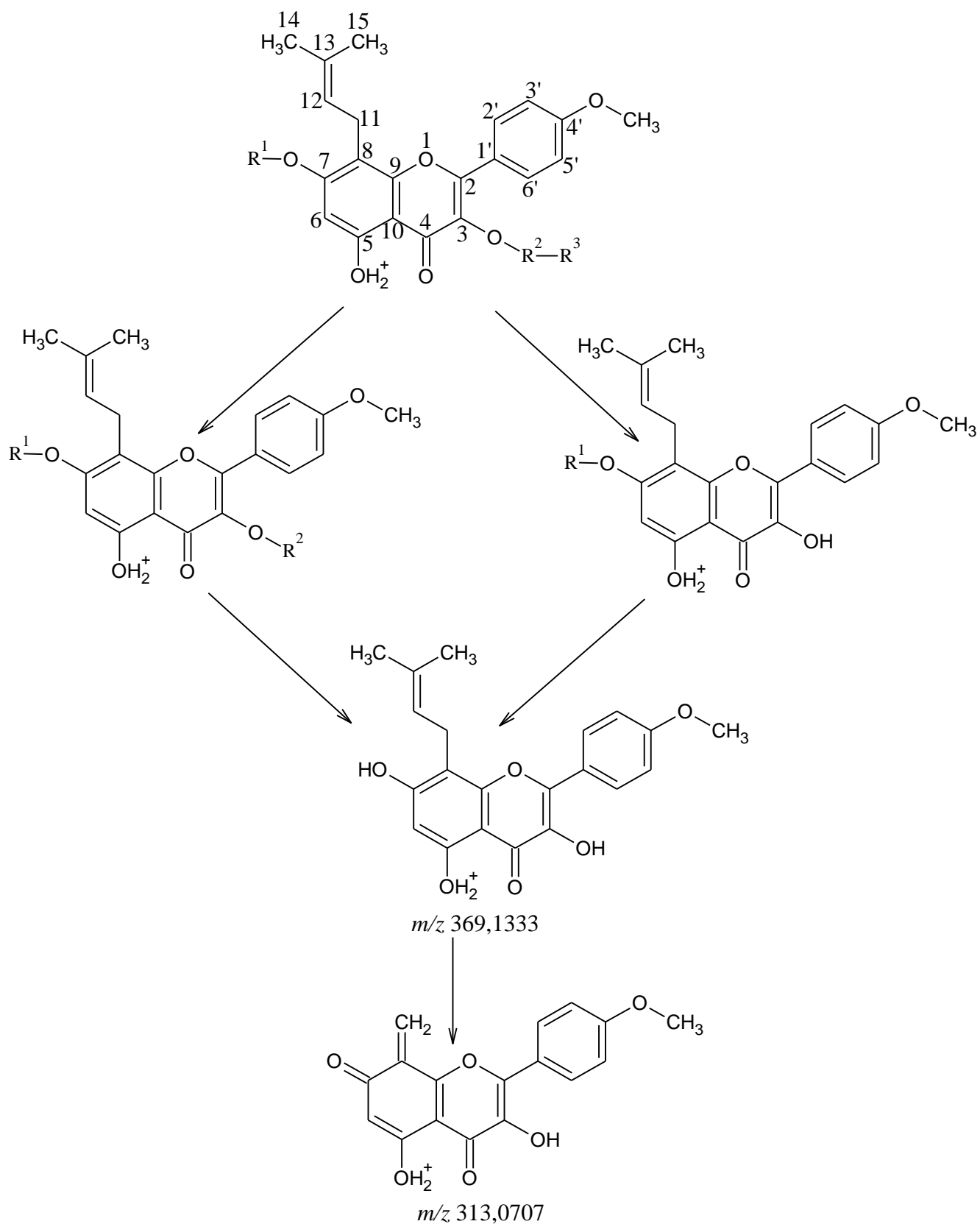


Рис. 18. Предположительная схема фрагментации флавоноидов горянки, где для икариина: R^1 - глюкозил, R^2 - рамнозил, R^3 - водород; для икаритина: R^1 , R^2 , R^3 - водород; для икаризида I: R^1 - глюкозил, R^2 , R^3 - водород; для икаризида II: R^1 , R^3 - водород, R^2 - рамнозил; для эпимедина А: R^1 , R^3 - глюкозил, R^2 - рамнозил; для эпимедина В: R^1 - глюкозил, R^2 - рамнозил, R^3 - ксилозил.

Третий шаг заключался в создании библиотеки МСⁿ-спектров исследованных соединений, которая необходима для поиска подобных спектров при обнаружении неизвестных действующих компонентов растений рода *Epimedium*.

Последним этапом, позволяющим упростить обнаружение флавоноидов горянки, являлось создание алгоритма масс-спектрометрического детектирования с использованием зависимого сканирования при регистрации нейтральных потерь (132,0423, 146,0579 и 162,0528 Да, указывающих на отщепление ксилозного, рамнозного и глюкозного остатков соответственно). В данном методе каждое последующее МС сканирование запускается только для ионов-продуктов, полученных при предыдущем МС сканировании с предварительно установленными величинами нейтральных потерь.

Эффективность разработанного метода подтвердили установлением структуры неизвестного компонента в экстракте горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*), который готовили согласно разд. 2.7.2. Время выхода анализа составляло 4,2 мин. (рис. 19А). В МС⁴-спектре данного соединения присутствовали ионы с m/z 369,1333 и 313,0707, указывающие на принадлежность к флавоноидам горянки (рис. 19Б). Фрагментный ион с m/z 531,1861 в МС³-спектре отличается от иона с m/z 369,1333 в МС⁴-спектре на 162,0528 Да, что соответствует отщеплению глюкозного остатка, вероятно, в положении С7, так как именно при этом углеродном атоме связь с углеводной группой более стабильна, чем при С3. Ион-продукт с m/z 677,2440 в МС²-спектре отличается от иона с m/z 531,1861 в МС³-спектре на массу рамнозного остатка (146,0579 Да), а МС²-спектр неизвестного соединения подобен МС-спектру икариина, что указывает на рамнозный заместитель в структуре исследуемого компонента в положении С3. Масс-спектр первого порядка содержит интенсивный ион с m/z 823,3019, который, вероятно, соответствует протонированной молекуле $[M+H]^+$, а нейтральная

потеря 146,0579 Да в МС²-спектре показывает наличие двух рамнозных групп в положении С3.

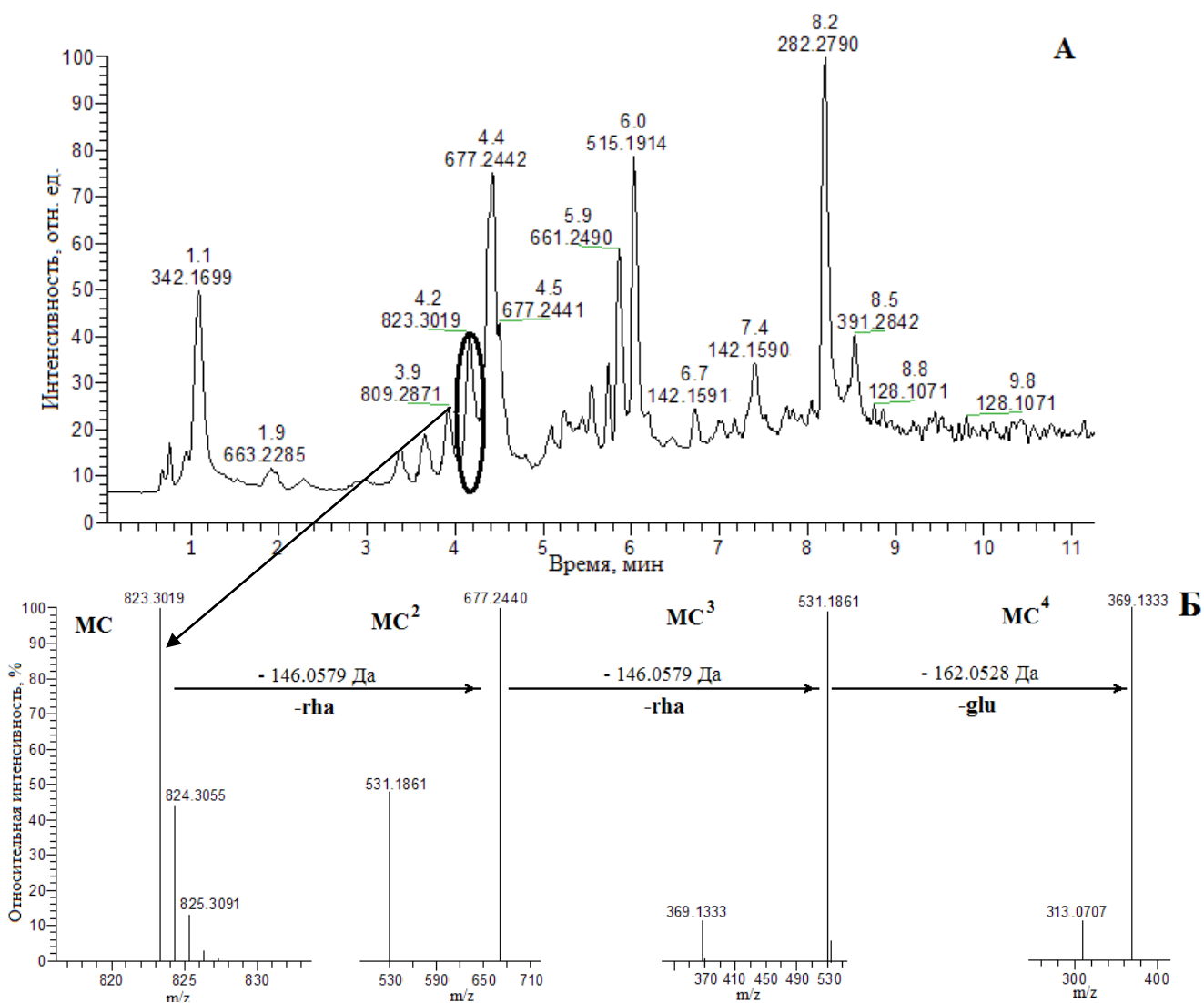


Рис. 19. Хроматограмма по полному ионному току этанольного экстракта горняки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*) (А) и МСⁿ-спектры соединения со временем выхода 4,2 мин (Б).

Таким образом, предполагаемая структура неизвестного соединения согласно литературным данным [96, 204], соответствует эпимедину С (рис. 20).

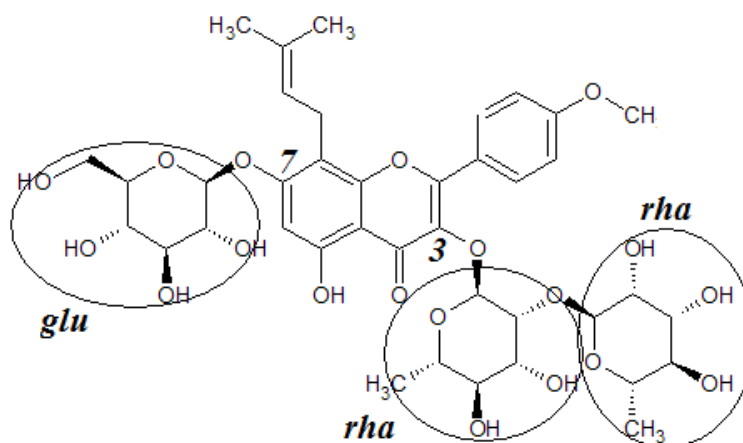


Рис. 20. Структурная формула эпимедина С (брутто-формула $C_{39}H_{50}O_{19}$, $M=822,2946$), где glu- глюкозил, rha – рамнозил.

С целью дополнительного подтверждения, что исследуемый компонент является эпимедином С, преобрили СО данного соединения и изучили его хроматографические параметры (табл. 16, рис. 21) и фрагментацию (табл. 17).

Таблица 16 – Параметры хроматографического разделения СО эпимедина С на колонке Hypersil Gold aQ ($150 \times 2,1$ мм, размер зерна сорбента 3 мкм) при скорости потока 0,6 мл/мин (при расчётах использовали величину мёртвого времени, равного 0,7 мин)

Вещество	Время удерживания, мин	Разрешение пиков	Коэффициент селективности
Эпимедин С	4,19	1,7	1,1

Таблица 17 – Характеристичные фрагментные ионы эпимедина С в МСп-спектрах, полученных в условиях диссоциации, индуцируемой соударением

Соединение		МС	МС ²	МС ³	МС ⁴
[ион-предшественник]: <i>m/z</i> (I _{отн} %)	Эпимедин С	823,3019 (100)	[823,3019]: 677,2440 (100), 531,1861 (50), 823,3019 (35)	[823,3019→677,2440]: 531,1861 (100), 677,2440 (30), 369,1333 (12), 823,3019 (6)	[809,2863→677,2440→ 531,1861]: 369,1333 (100) 313,0707 (12)

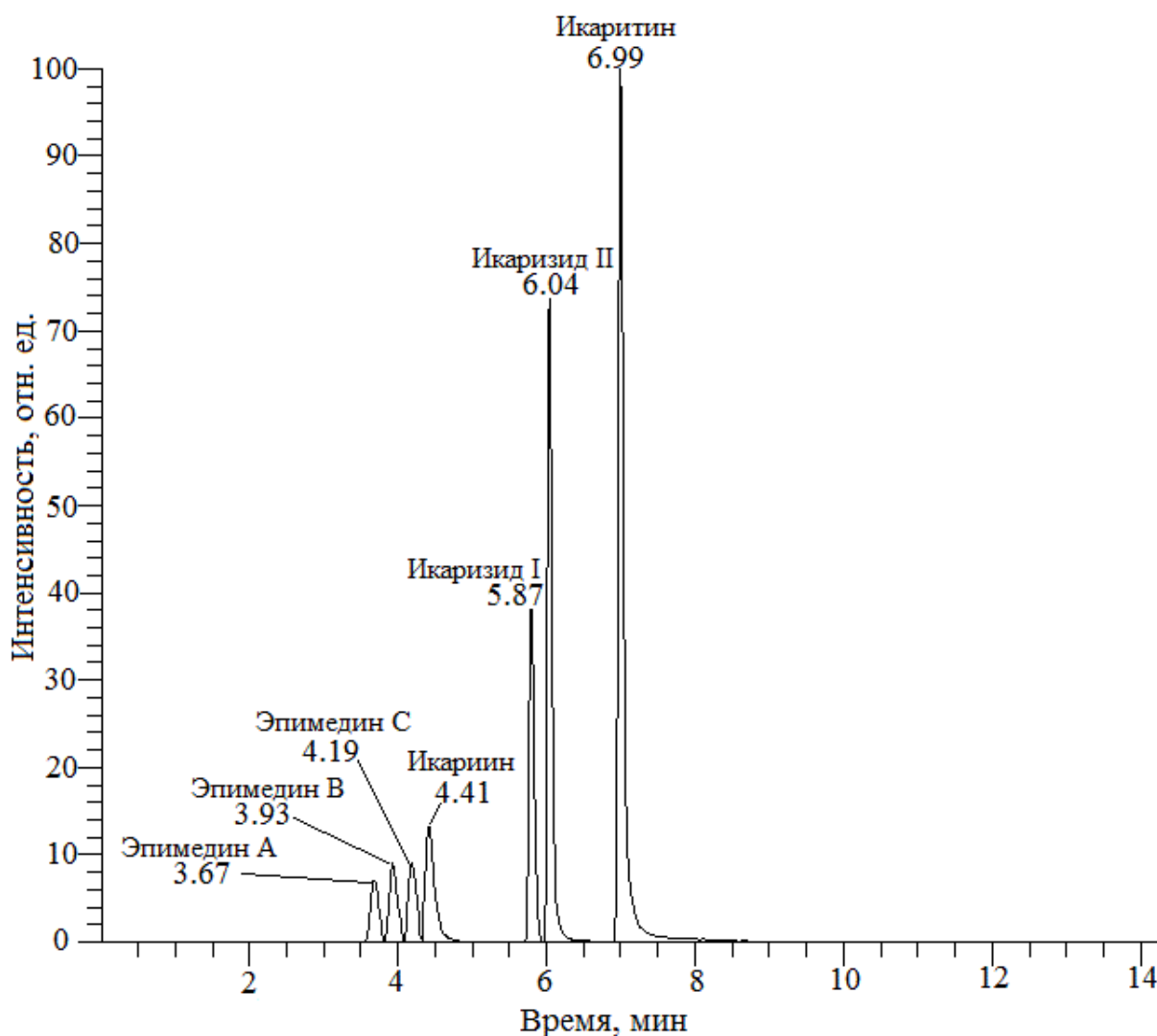


Рис. 21. Хроматограммы в режиме сканирования по выбранным ионным переходам раствора, содержащего 0,1 мкг/мл икариина, икаритина, эпимединов А, В, С и икаризидов I, II.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что неизвестное соединение – эпимедин С в экстракте горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*).

Таким образом, с использованием метода тандемной масс-спектрометрии при ионизации электрораспылением изучена фрагментация положительно заряженных ионов основных флавоноидов горянки – икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В, определены характеристичные фрагментные ионы, позволяющие подтвердить принадлежность неизвестных соединений к действующим компонентам растений рода *Epimedium*.

3.3 Разработка способа экстракции флавоноидов из горянки

Очевидно, что качество фармакологических препаратов, создаваемых на основе растительного сырья, зависит от технологий извлечения БАВ из лекарственных растений. Экстракция является важным этапом любого исследования лекарственных растений, и играет решающую роль в получении конечных результатов. В разд. 1.2 приведена информация по способам экстракции флавоноидов горянки. Однако, в большинстве своём, все они сводятся к выделению основных компонентов традиционными органическими растворителями в различных условиях и имеют ряд недостатков, основным из которых является необходимость удаления растворителя из экстракта. В настоящее время технология экстрагирования лекарственного растительного сырья сверхкритическими газами является перспективным методом получения экстрактов БАВ. Данный способ позволяет рационально использовать растительное сырьё и энергоресурсы, а экстракты, полученные с применением этих методов, дают возможность расширить номенклатуру новых фитопрепаратов [177]. В связи с этим становится актуальной задача исследования возможности применения СК-СО₂ для выделения флавоноидов из горянки, а также сравнительная оценка количественного содержания активных компонентов в экстрактах, полученных извлечением сверхкритическим диоксидом углерода и методом жидкостной экстракции. Эксперимент осуществляли согласно разд. 2.7.3.

Основными параметрами, влияющими на эффективность экстракции, являются её продолжительность, давление и температура. Влияние данных параметров на общее количество извлекаемых флавоноидов показано на рис. 22-24.

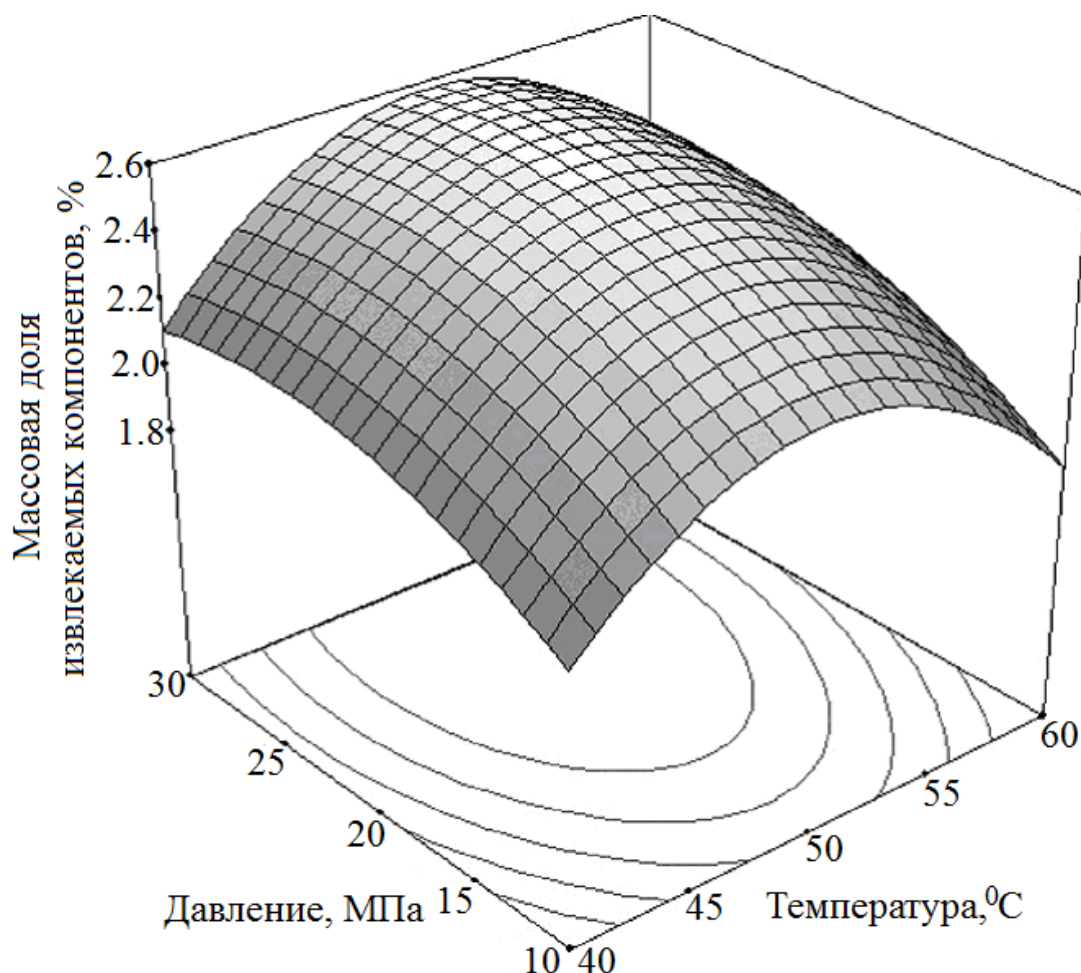


Рис. 22. 3D-график зависимости суммарной массовой доли извлекаемых флавоноидов (%) от давления и температуры при времени экстракции 30 мин.

Зависимость на рис. 22 показывает, что с увеличением давления наблюдается повышение суммарного выхода флавоноидов с достижением его максимального значения при величине 30 МПа на уровне 2,6% от массы экстрагируемого сырья. Эффективность экстракции достигает максимального значения при температуре 50 °С. Снижение или повышение температуры приводит к уменьшению выхода целевых компонентов.

Проанализировав данные рис. 23, делаем вывод, что в качестве оптимального времени экстракции можно принять 30 мин. Дальнейшее увеличение продолжительности процесса приводит к дополнительным экономическим затратам (в том числе, на со-растворитель и сверхкритический CO_2).

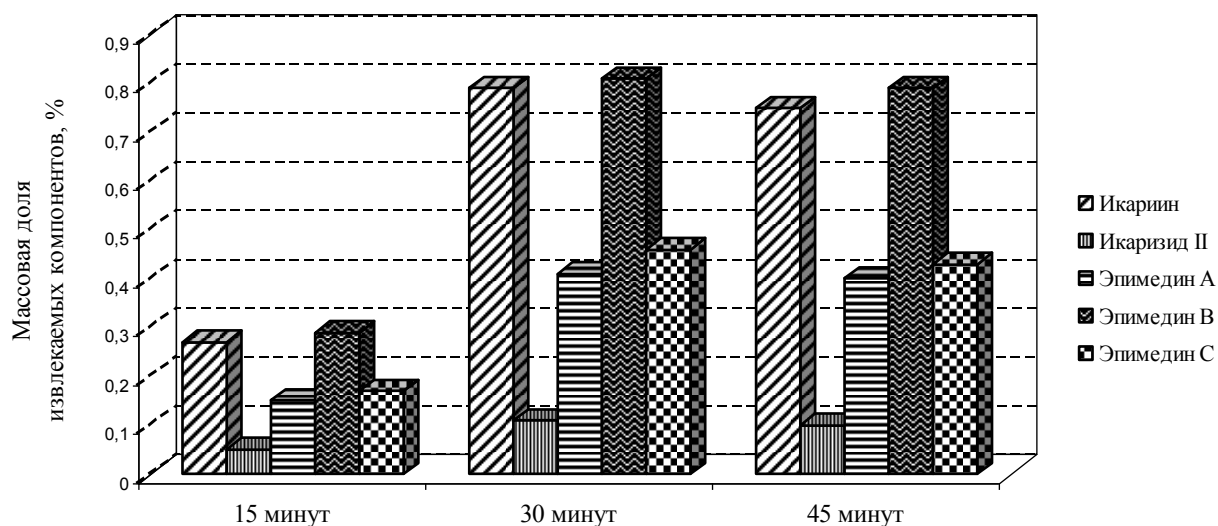


Рис. 23. Выход целевых компонентов при различном времени экстракции.

Для оценки эффективности метода СК-СО₂ было проведено сравнение его с традиционным методом жидкостной экстракции 50%-ным этанолом под действием ультразвука.

На рис. 24 представлена диаграмма, показывающая количество извлекаемых биологически активных соединений при использовании данных методов экстракции.

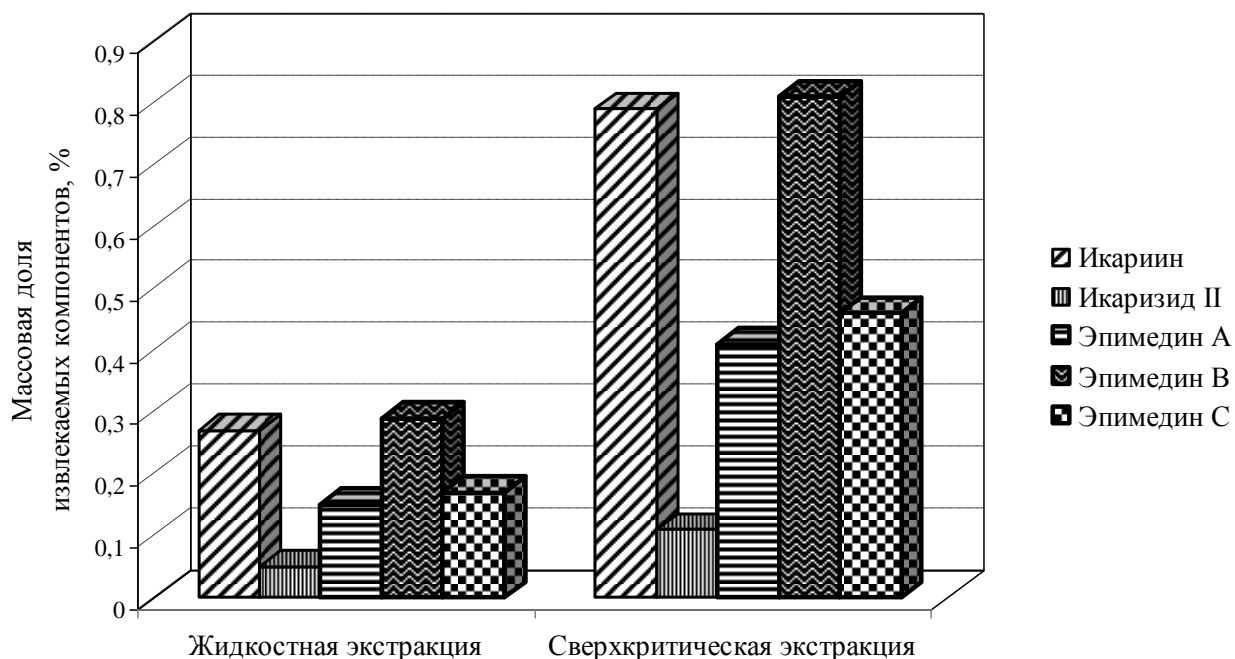


Рис. 24. Выход извлекаемых компонентов при использовании различных методов экстракции.

Из представленных данных видно, что суммарное количество извлекаемых компонентов методом СК-СО₂ в 2,5 раза выше, чем с помощью

жидкостной экстракции этанолом под действием ультразвука. Варьирование параметров экстракции позволяет регулировать выход целевых веществ. Установлено, что максимальный выход действующих компонентов достигается при температуре 50 °С, давлении 30 МПа и продолжительности 30 мин.

3.4 Разработка способа определения флавоноидов горянки в моче

В последние годы для идентификации и определения флавоноидов горянки все чаще используют ВЭЖХ/МС, где подготовка проб биологических образцов включает в себя осаждение белков и обессоливание органическим растворителем или жидкостно-жидкостную экстракцию этилацетатом (разд. 1.5).

В данной работе исследовали различные способы экстракции икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В из мочи и влияние матрицы на степень ионизации при определении действующих компонентов. Эксперимент осуществляли согласно разд. 2.7.4, а условия, выбранные в разд. 3.1.2, применяли для хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования.

В качестве модельной биожидкости использовали мочу человека. Для получения образца с концентрацией целевых веществ 0,1 мкг/мл в 5 мл мочи вносили 0,1 мл раствора икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В с концентрацией 5 мкг/мл, полученного в результате последовательного разбавления метиловым спиртом исходного раствора с концентрацией 0,1 мг/мл, приготовленного согласно разд. 2.6.5. В качестве бланкового образца использовалась моча без внесения активных компонентов.

Учитывая свойства аналитов, метод анализа и объект исследований было выбрано несколько направлений разработки процедур подготовки проб.

1. Анализ супернатанта после обессоливания ацетонитрилом и центрифугирования.

2. ЖЖЭ. С целью выбора оптимального метода исследовали три типа экстракции: щелочную, нейтральную и кислую с использованием экстрагирующих систем с разными индексами полярности и элюирующей силой [91], таких как хлористый метилен; ацетонитрил; смесь диэтилового и трет-бутилметилового эфиров в соотношении 9:1 (по объёму); смесь гексана с хлористым метиленом в соотношении 85:15 (по объёму); смесь изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму).

Поскольку исследуемые вещества метаболизируют в организме возможно с образованием глюкуроновых производных необходимо проведение процедуры деглюкуронирования с использованием соответствующих ферментов.

При проведении ферментативного гидролиза с бета-глюкуронидазой обнаружено, что ещё до инкубирования флавоноиды горянки гидролизуются, икариин, например, до икаризида II и икаритина (рис. 25), что делает невозможным использование данного фермента для процесса подготовки проб биологических образцов с целью обнаружения непосредственно активных компонентов, однако может быть использован для группового определения флавоноидов горянки.

3. ТФЭ. Для подготовки проб были выбраны картриджи SUPELCO DSC-18 (с неполярным сорбентом силикагелем С-18) и HLB. Последние представляют собой модифицированный полистирол и благодаря развитой гидрофильно-липофильной поверхности сорбента способны удерживать широкий диапазон соединений с разной полярностью. Для ТФЭ характерны более широкие возможности для селективного извлечения и концентрирования извлекаемых аналитов, чем для ЖЖЭ. Также следует отметить, что при валидации аналитической методики использование ТФЭ практически полностью приводит к выполнению требований по повторяемости и правильности. Однако у данной процедуры есть и недостатки, среди которых дороговизна и трудоёмкость.

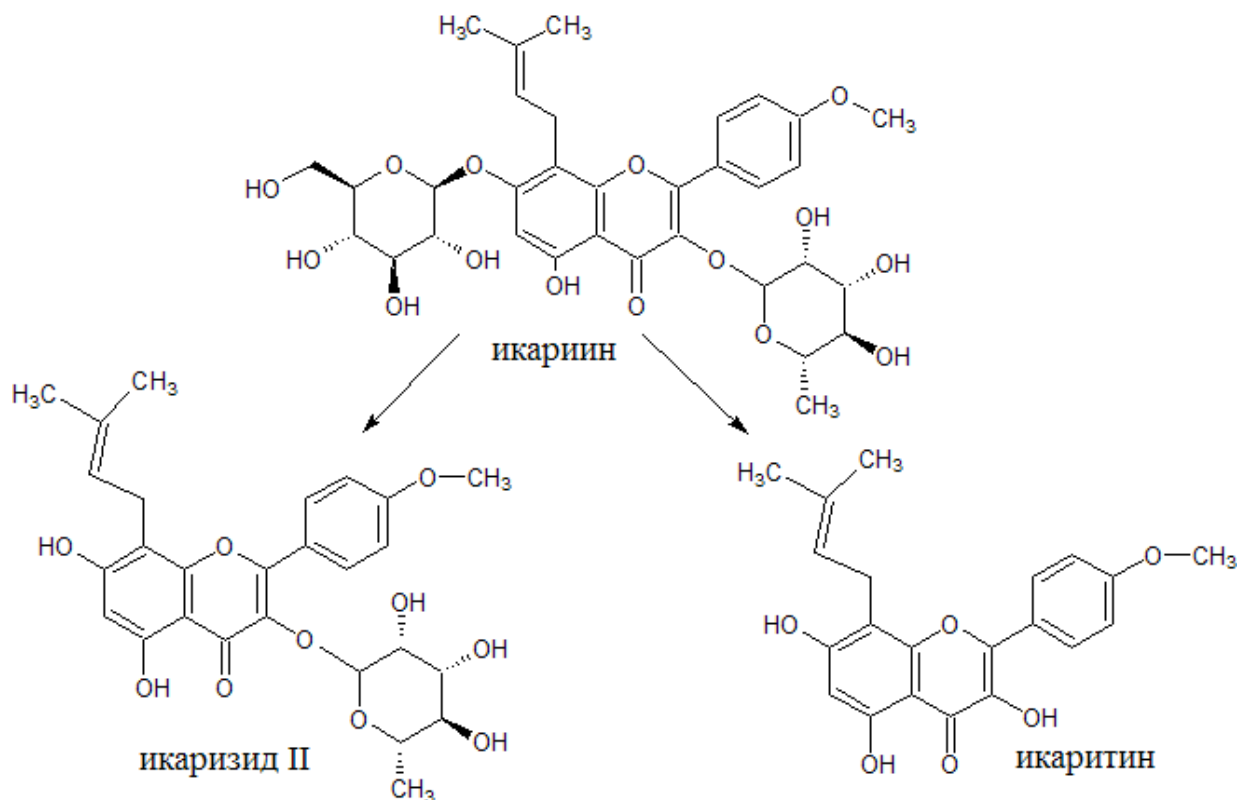


Рис. 25. Схема гидролиза икариина под действием бета-глюкуронидазы.

Контроль полноты экстракции и остальных аналитических этапов подготовки проб (таких как очистка и концентрирование образца) проводили методом добавок внутреннего стандарта (близкое по структуре и экстракционным свойствам соединение – куместрол (рис. 6)) [138, 143, 206].

Идентификацию аналитов в образцах проводили по трём параметрам: время удерживания аналитов и внутреннего стандарта (рис. 26), выбранные характеристичные ионные переходы и соотношения интенсивностей фрагментных ионов, которые оставались постоянными в широком диапазоне концентраций (табл. 11). Оптимальная энергия столкновений для внутреннего стандарта составила 50 В, а ионный переход — с m/z 269,0445 → 241,0491 (100%), 197,0595 (100%), 213,0543 (72%), 225,0543 (25%) (рис. 27).

Результаты выбора процедур подготовки проб представлены в табл. 18.

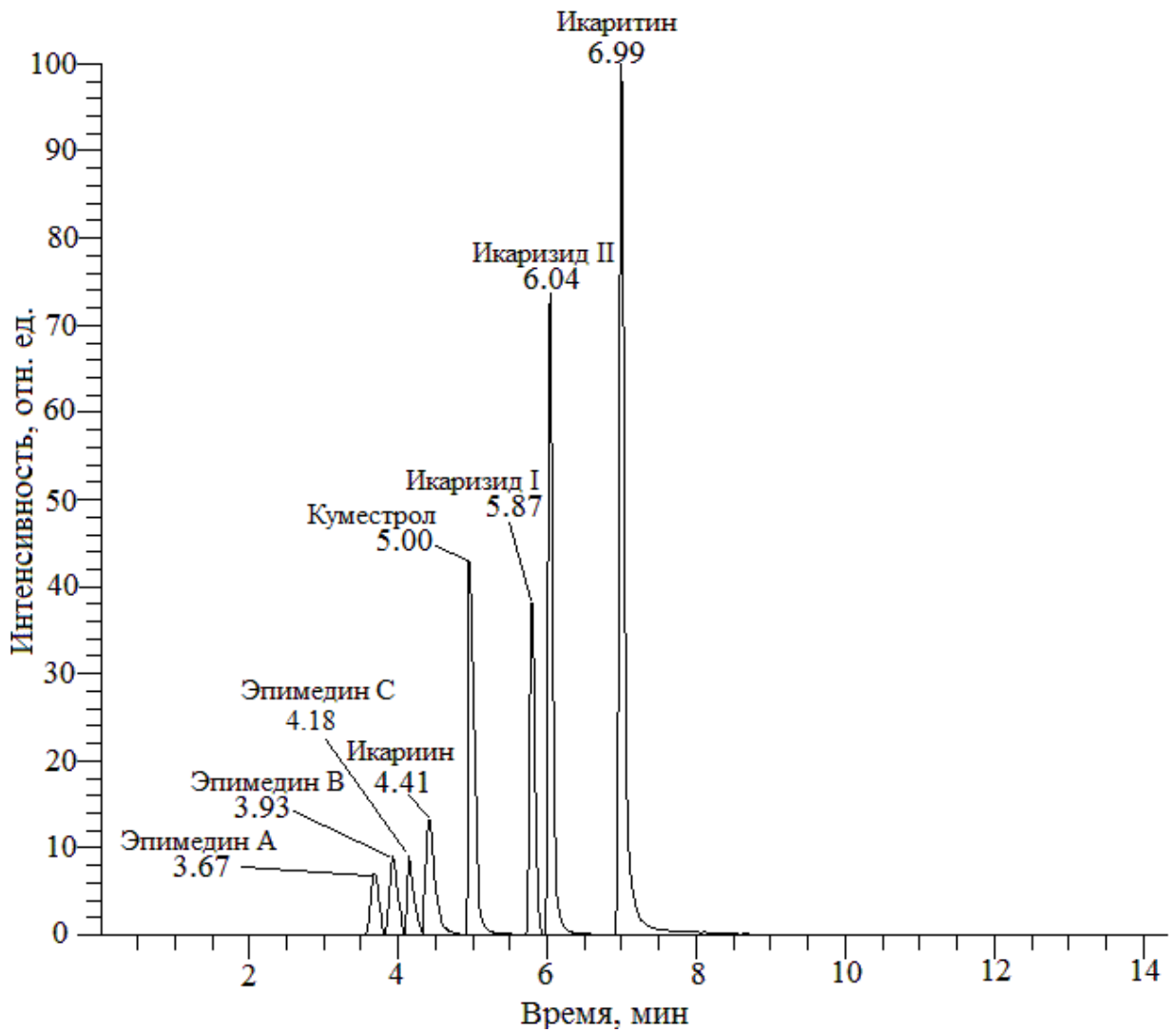


Рис. 26. Хроматограммы в режиме сканирования по выбранным ионным переходам раствора, содержащего 0,1 мкг/мл икариина, икаритина, эпимединов А, В, икаризидов I, II и куместрола (внутреннего стандарта).

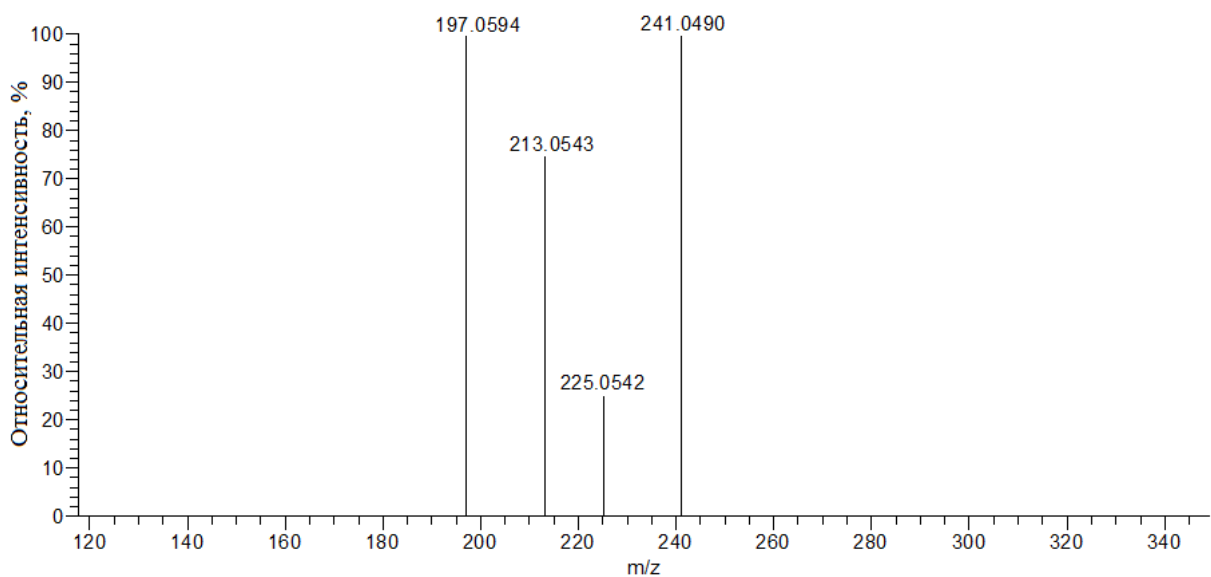


Рис. 27. МС/МС-спектр пика, соответствующего куместролу (внутреннему стандарту) в режиме регистрации положительно заряженных ионов при энергии фрагментации - 50 В.

Таблица 18 – Коэффициенты извлечения аналитов при использовании различных процедур подготовки проб (P=0,95, n=10)

Тип экстракции	Экстрагирующая система	Коэффициент извлечения, %						
		икариина	икаритина	икаризида I	икаризида II	эпимедина А	эпимедина В	эпимедина С
ЖЖЭ кислая	Хлористый метилен	19±2	23±4	25±4	17±2	18±3	21±3	20±3
	Ацетонитрил	53±6	56±7	60±6	52±7	51±7	55±4	56±4
	Диэтиловый эфир: трет-бутилметиловый эфир (9: 1 по объёму)	15±3	20±4	21±3	13±2	14±3	19±4	20±4
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0	0	0	0	0	0	0
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40: 30:30 по объёму)	35±5	38±5	35±6	34±4	33±4	36±5	37±5
ЖЖЭ щелочная	Хлористый метилен	2,0±0,4	4,3±0,3	1,1±0,1	0	0	0	0
	Ацетонитрил	79±6	84±7	86±5	76±6	75±7	71±5	70±5
	Диэтиловый эфир: трет-бутилметиловый эфир (9: 1 по объёму)	9,0±1,7	8,0±0,9	5,1±0,4	9,3±1,0	7,2±1,3	8,4±1,2	7,9±0,9
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0	0	0	0	0	0	0
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат	73±3	80±5	74±4	75±5	69±3	65±5	64±4

Тип экстракции	Экстрагирующая система	Коэффициент извлечения, %						
		икариина	икаритина	икаризида I	икаризида II	эпимедина А	эпимедина В	эпимедина С
	(40:30:30 по объёму)							
ЖЖЭ нейтральная	Хлористый метилен	6,0±1,9	10±1	4,3±0,4	5,6±0,5	3,5±0,3	3,7±0,2	3,1±0,3
	Ацетонитрил	72±4	80±5	73±4	75±6	64±4	62±5	61±4
	Диэтиловый эфир: трет-бутилметилловый эфир (9: 1 по объёму)	31±3	36±5	26±2	24±2	35±6	33±5	31±3
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0	0	0	0	0	0	0
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму)	49±4	54±5	45±4	41±4	39±3	37±4	36±4
ТФЭ SUPELCO HLB 200 мг		97±6	98±5	95±3	94±4	93±5	93±4	93±3
ТФЭ DSC-18 200		90±4	94±3	91±6	90±6	88±4	86±4	87±3
Прямой анализ		99±7	99±5	97±7	98±9	95±8	94±8	95±7

Из результатов, представленных в таблице 18, видно, что наибольшего извлечения удалось достигнуть при проведении прямого анализа супернатанта и после сорбционного концентрирования с картриджами SUPELCO DSC-18 и HLB. Приведенные данные также свидетельствуют о том, что при проведении ЖЖЭ две экстрагирующие системы: ацетонитрил и смесь изобутилового, изопропилового спиртов и этилацетата в щелочных условиях показывают наилучшие коэффициенты по извлечению.

Для оценки селективности выбранных характеристичных ионных переходов изучили влияние мешающих фоновых веществ в биологической жидкости, проанализировав 20 экстрактов бланковых образцов мочи. На каждой хроматограмме производили анализ участков, соответствующих временам удерживания определяемых веществ в пределах одной минуты. Селективность считали приемлемой, если на всех хроматограммах на указанных участках не было интерферирующих пиков с отношением сигнал/шум более или равным 3:1.

На специфичность и чувствительность определения веществ с использованием масс-селективного детектора могут влиять компоненты биологической матрицы, которые могут коэлюироваться совместно с аналитами, оказывая влияние на процесс ионизации в масс-спектрометре [207], подавляя или усиливая её [208, 209]. Этот феномен был впервые описан в 1993 г. и получил название «матричный эффект» [210].

Основной причиной подавления ИЭР является изменение свойств спрея из-за наличия матричных (биогенных) удерживаемых соединений, влияющих на эффективность образования или испарения капель в спрее, тем самым, на количество заряженных ионов в газовой фазе, попадающих затем в масс-спектрометр [211-213].

Матричный фактор вычисляли по формуле (1), представленной в работах [183, 214].

$$MF = \frac{S_1}{S_2}, \quad (1)$$

где S_1 – площадь пика для пробы с добавкой аналита в матрицу после её пробоподготовки;

S_2 – площадь пика для стандартного раствора аналита.

Матричный эффект часто связан с недостаточной очисткой биологических образцов. Влияние матрицы при прямом анализе супернатанта значительно больше, чем при ТФЭ с картриджами SUPELCO DSC-18 и HLB (табл. 19).

Учитывая степень экстракции и матричный эффект, делаем вывод, что наиболее приемлемым способом подготовки проб является ТФЭ с картриджами HLB.

Для оценки влияния используемых в процессе подготовки образцов биологических проб реактивов на степень ионизации аналитов провели анализ экстракта воды. При этом существенного матричного эффекта не наблюдали.

Сравнительный анализ 20 образцов мочи показал, что степень извлечения аналитов и матричный эффект не изменяются от образца к образцу.

Таким образом, в результате проведённых экспериментальных исследований разработана методика определения флавоноидов горянки в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием ЭРИ в режиме регистрации выбранных ионных переходов для положительно заряженных ионов. Оценены степень извлечения и влияние матрицы на ионизацию аналитов. Разработанный способ является специфичным и чувствительным, позволяющим сочетать как качественное, так и количественное определение флавоноидов горянки в биопробах.

Таблица 19 – Результаты исследований по выбору процедур пробоподготовки (P=0,95, n=10)

Тип экстракции	Экстрагирующая система	Матричный фактор						
		икариин	икаритин	икаризид I	икаризид II	эпимедин А	эпимедин В	эпимедин С
ЖЖЭ кислая	Хлористый метилен	0,74±0,09	0,69±0,08	0,71±0,08	0,82±0,09	0,79±0,11	0,71±0,09	0,73±0,12
	Ацетонитрил	0,81±0,08	0,75±0,11	0,74±0,11	0,79±0,10	0,78±0,11	0,76±0,09	0,82±0,08
	Диэтиловый эфир: трет-бутилметиловый эфир (9: 1 по объёму)	0,58±0,08	0,51±0,07	0,59±0,09	0,54±0,08	0,50±0,08	0,49±0,05	0,51±0,11
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0,75±0,09	0,79±0,11	0,74±0,12	0,73±0,11	0,78±0,14	0,69±0,08	0,75±0,08
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40: 30:30 по объёму)	0,85±0,12	0,84±0,11	0,81±0,12	0,79±0,09	0,78±0,12	0,83±0,07	0,82±0,08
ЖЖЭ	Хлористый метилен	0,71±0,05	0,74±0,09	0,69±0,08	0,65±0,01	0,67±0,12	0,71±0,08	0,69±0,12

Тип экстракции	Экстрагирующая система	Матричный фактор						
		икариин	икаритин	икаризид I	икаризид II	эпимедин А	эпимедин В	эпимедин С
	Ацетонитрил	0,73±0,09	0,69±0,11	0,70±0,09	0,74±0,08	0,71±0,05	0,79±0,05	0,75±0,08
	Диэтиловый эфир: трет-бутилметиловый эфир (9: 1 по объёму)	0,49±0,05	0,51±0,06	0,53±0,07	0,54±0,09	0,56±0,08	0,58±0,06	0,54±0,09
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0,81±0,08	0,79±0,07	0,80±0,04	0,79±0,08	0,75±0,09	0,76±0,05	0,82±0,08
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму)	0,86±0,09	0,84±0,10	0,81±0,11	0,80±0,09	0,82±0,07	0,81±0,08	0,82±0,09
	Хлористый метилен	0,69±0,05	0,65±0,08	0,66±0,06	0,61±0,09	0,64±0,08	0,61±0,09	0,68±0,08
ЖЖЭ нейтральная	Ацетонитрил	0,84±0,09	0,81±0,08	0,89±0,08	0,83±0,09	0,82±0,05	0,81±0,08	0,79±0,09
	Диэтиловый эфир: трет-бутилметиловый эфир (9: 1 по объёму)	0,44±0,07	0,43±0,06	0,45±0,05	0,45±0,01	0,46±0,02	0,48±0,01	0,51±0,03

Тип экстракции	Экстрагирующая система	Матричный фактор						
		икариин	икаритин	икаризид I	икаризид II	эпимедин А	эпимедин В	эпимедин С
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0,82±0,08	0,81±0,05	0,82±0,06	0,81±0,03	0,79±0,04	0,81±0,05	0,83±0,03
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму)	0,74±0,08	0,79±0,06	0,75±0,07	0,73±0,08	0,69±0,08	0,64±0,09	0,79±0,06
	ТФЭ SUPELCO HLB 200 мг	0,94±0,09	0,95±0,09	0,97±0,05	0,98±0,06	0,97±0,05	0,94±0,06	0,96±0,08
	ТФЭ DSC-18 200 мг	0,91±0,01	0,92±0,05	0,89±0,06	0,88±0,05	0,94±0,07	0,95±0,04	0,93±0,09
	Прямой анализ	1,32±0,11	1,34±0,09	1,24±0,09	1,10±0,08	1,10±0,09	1,12±0,08	1,01±0,07

3.5 Обнаружение метаболитов флавоноидов горянки в моче крыс

Основным преимуществом применения тандемной масс-спектрометрии является получение дополнительной информации, которая позволяет доказать структурное сходство веществ, определяемых в биосредах (предположительных метаболитов), с исходными веществами, основываясь на закономерностях фрагментации целевых соединений и удерживании. Данный метод является одним из основных для доказательства структуры метаболитов по причине крайне незначительного количества вещества и сложности матрицы, что делает невозможным применение таких методов, как ЯМР и инфракрасная спектроскопия.

Для обнаружения метаболитов флавоноидов горянки методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения в разд. 3.1 провели детальное изучение фрагментации имеющихся в наличии стандартов: икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов A, B, C.

При изучении фрагментации имеющихся стандартных образцов икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов A, B, C выявили следующие закономерности: для флавоноидов горянки характерно последовательное отщепление углеводных заместителей, при этом сначала происходит потеря углеводных групп в положении C3, затем в положении C7 с образованием ион-продукта с m/z 369,1333, а перегруппировка изопентеновой группы в положении C8 приводит к появлению ион-продукта с m/z 313,0707. Таким образом, m/z 369,1333 и 313,0707 являются характеристичными массами при обнаружении флавоноидов горянки и отнесении соединений к данному классу.

Метод масс-спектрометрического детектирования с использованием нейтральных потерь (132,0423, 146,0579 и 162,0528 Да, указывают на отщепление ксилозного, рамнозного и глюкозного остатков, соответственно), позволил значительно упростить обнаружение метаболитов флавоноидов горянки, так как выбор иона для фрагментации определяется при МС сканировании по предварительно установленным величинам нейтральных

потерь. Используя предложенный нами метод тандемного масс-спектрометрического детектирования, помимо основных действующих компонентов горянки: икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В, С (рис. 28) в моче крыс удалось обнаружить несколько соединений, отсутствующих в экстракте горянки коротконожковой (*Epimedium brevicornum*) и в бланковых образцах мочи, предположительно принадлежащих к метаболитам (М1-6). Для установления возможной структуры метаболитов были изучены МСⁿ-спектры данных соединений.

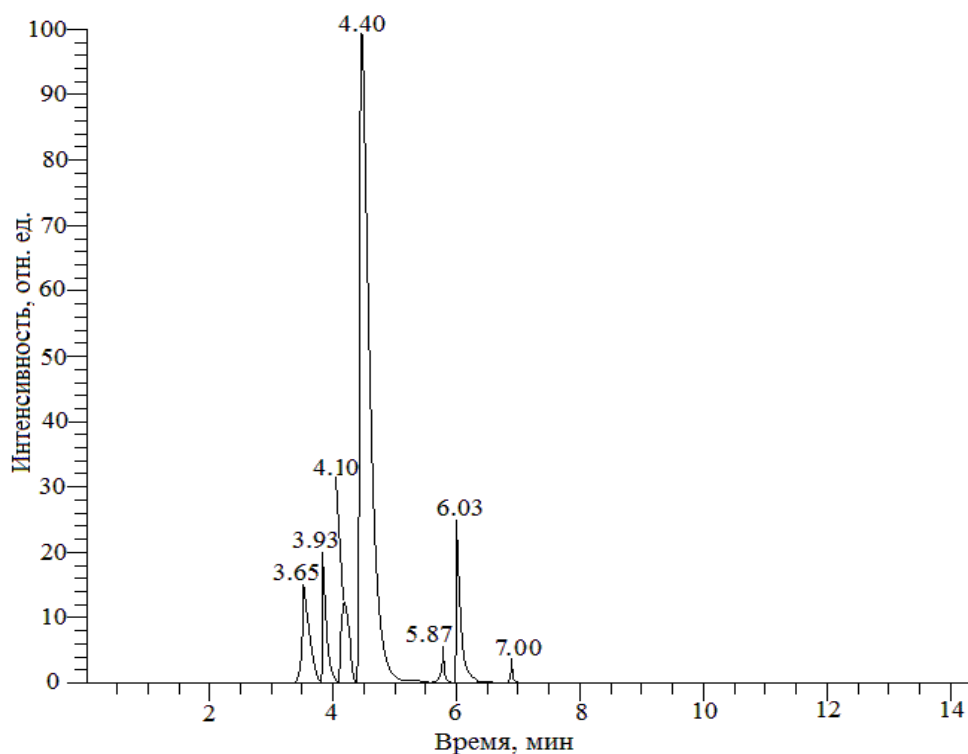


Рис. 28. Хроматограмма в режиме сканирования по выбранным ионным переходам мочи крыс через 12 часов после приёма экстракта горянки.

В МС³-спектре соединения М1 со временем выхода 4,8 мин присутствовал ион с m/z 313,0707, указывающий на возможную принадлежность к флавоноидам горянки (рис. 29В). Ион с m/z 367,1175 отличается от характеристичного для флавоноидов фрагментного иона 369,1333 на 2,0158 Да, что говорит о наличии двойной связи, возможно, вследствие отщепления гидроксильной группы в изопентеновой цепи (рис. 29Г). Фрагментный ион с m/z 547,1812 в МС²-спектре отличается от иона с m/z 385,1280 в МС³-спектре на 162,0528 Да, что соответствует отщеплению глюкозного остатка, вероятно, в положении С7, так как именно при этом углеродном атоме связь с углеводной группой более стабильна, чем при С3.

Ион-продукт с m/z 693,2392 в масс-спектре первого порядка отличается от иона с m/z 547,1812 в МС²-спектре на массу рамнозного остатка (146,0579 Да), что указывает на данный заместитель в структуре исследуемого компонента, возможно, в положении С3. Интенсивный ион с m/z 693,2392 в МС-спектре, вероятно, соответствует протонированной молекуле $[M+H]^+$ (рис. 29Б), а ион с m/z 737,2293 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов - депротонированной молекуле аддукта с муравьиной кислотой (рис. 29А).

Полученные данные были сопоставлены с результатами программного обеспечения ACDLabs/ biotransformation maps (версии 14.0), ACDLabs/Percepta, указывающими на гидроксирование в положении С14 или С15 как возможный путь метаболизма. Таким образом, вероятная структура метаболита М1 представлена на рис. 29Д. С применением программы метаболомного анализа полученных хромато-масс-спектрометрических данных MetWorks версии 1.3 фирмы «Thermo Scientific» в экстрактах проб было подтверждено наличие данного метаболита.

Согласно проведённым исследованиям, алгоритм интерпретации данных, полученных методом ВЭЖХ-МСⁿ в режиме зависимого сканирования ионов-продуктов с предварительно установленными значениями нейтральных потерь (132,0423, 146,0579 и 162,0528 Да) состоит в следующем:

1. Поиск в спектрах m/z характеристичных фрагментных ионов флавоноидов горянки (m/z 369,1333 (367,1176) и 313,0707).

2. Установление структуры соединения на основании характерной фрагментации (последовательное отщепление углеводных заместителей: сначала происходит потеря групп в положении С3, затем в положении С7).

3. Сравнение экспериментальных значений m/z с теоретическими (расхождение не более 5 м.д.).

4. Сопоставление полученных данных с результатами программного обеспечения ACDLabs/ biotransformation maps (версии 14.0), ACDLabs/Percepta, MetWork (версии 1.3).

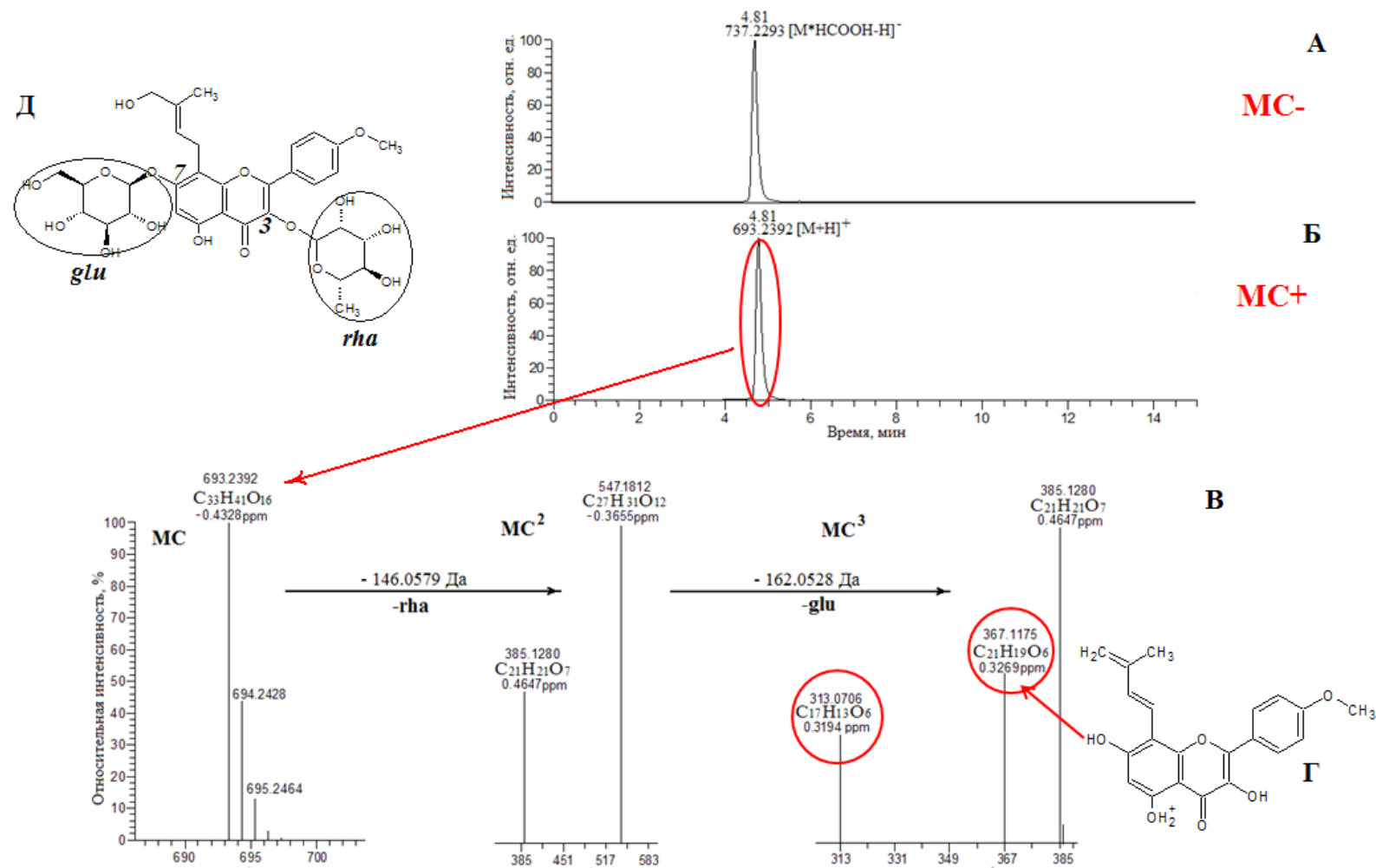
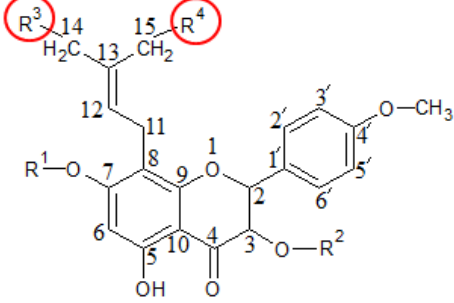


Рис. 29. Хроматограмма пробы мочи: по выделенному иону с m/z 737,2293 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (А), по выделенному иону с m/z 693,2392 в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Б); MS^n -спектры соединения со временем выхода 4,81 мин (В); предположительная структура фрагментного иона с m/z 367,1175 (Г); возможная структура метаболита М1 (Д)

Используя данный алгоритм, были обнаружены метаболиты М2-М6 (рис. А3-А7 Приложения), вероятные структуры которых приведены в табл. 20, а характеристичные фрагментные ионы в MS^n -спектрах в табл. 21.

Таблица 20 – Предположительные структуры метаболитов флавоноидов горянки

Метаболит					
	R^1	R^2	R^3	R^4	Моноизотопная масса, Да
М1	glu	rha	ОН	Н	692,2316
М2	glu	Н	ОН	Н	546,1737
М3	Н	rha	ОН	Н	530,1788
М4	glu	rha-(1-2)glu	ОН	Н	854,2845
М5	glu	rha-(1-2)xyl	ОН	Н	824,2739
М6	glu	rha-(1-2)rha	ОН	Н	838,2895

Примечание: rha – рамнозил, glu – глюкозил, xyl - ксилозил

Таким образом, разработанный алгоритм позволяет выявлять основные компоненты горянки и их метаболиты и может использоваться для исследований фармакокинетических параметров.

Таблица 21 – Характеристичные фрагментные ионы метаболитов горянки в MSⁿ-спектрах, полученных в условиях диссоциации, индуцируемой соударением

Соединение	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴	
[Ион-предшественник]: m/z (I _{отн} , %)	M1	693,2392 (100) [M+H] ⁺	[693,2392]: 547,1812 (100) [M-rha] ⁺ , 385,1280 (50)	[547,1812]: 385,1280 (100) [M-glu] ⁺ , 367,1175 (50), 313,0707 (35)	-
	M2	547,1815 (100) [M+H] ⁺	[547,1815]: 385,1280 (100) [M-glu] ⁺ , 367,1175 (50), 313,0707 (35)	-	-
	M3	531,1857 (100) [M+H] ⁺	[531,1857]: 385,1280 (100) [M-rha] ⁺ , 367,1175 (50), 313,0707 (35)	-	-
	M4	855,2910 (100) [M+H] ⁺	[855,2910]: 693,2390 (100) [M-glu] ⁺ , 547,1815 (60)	[855,2910→693,2390]: 547,1812 (100) [M-glu-rha] ⁺ , 385,1280 (50)	[855,2910→693,2390→547,1812]: 385,1280 (100) [M-2glu-rha] ⁺ , 367,1175 (50), 313,0707 (35)
	M5	825,2820 (100) [M+H] ⁺	[825,2820]: 693,2390 (100) [M-xyl] ⁺ , 547,1815 (60)	[825,2820→693,2390]: 547,1812 (100) [M-glu-xyl] ⁺ , 385,1280 (50)	[825,2820→693,2390→547,1812]: 385,1280 (100) [M-2glu-xyl] ⁺ , 367,1175 (50), 313,0707 (35)
	M6	839,2975 (100) [M+H] ⁺	[839,2975]: 693,2390 (100) [M-rha] ⁺ , 547,1815 (60)	[839,2975→693,2390]: 547,1812 (100) [M-glu-rha] ⁺ , 385,1280 (50)	[839,2975→693,2390→547,1812]: 385,1280 (100) [M-2glu-rha] ⁺ , 367,1175 (50), 313,0707 (35)
Примечание: glu = глюкозил, rha = рамнозил, xyl = ксилозил.					

ВЫВОДЫ

1. Изучены закономерности формирования масс-спектров флавоноидов горянки методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Ключевыми этапами фрагментации являются: потеря групп в положении С3; затем в положении С7 с образованием иона-продукта с m/z 369,1333; перегруппировка изопентеновой группы в положении С8, приводящая к появлению иона-продукта с m/z 313,0707. Ионы с m/z 369,1333 и 313,0707 соответствуют характеристичным сигналам, используемым при обнаружении неизвестных флавоноидов горянки. Предложены возможные структуры фрагментных ионов.

2. Разработан способ извлечения флавоноидов горянки сверхкритическим диоксидом углерода. При температуре 50 °С, давлении 30 МПа и продолжительности 30 мин достигается максимальный выход целевых компонентов, в 2,5 раза превышающий количество соединений, извлекаемых жидкостной экстракцией этанолом в ультразвуковом поле.

3. Разработаны условия хроматомасс-спектрометрического определения икариина, икаритина, икаризидов I, II, эпимединов А, В, С в растительном сырье и продуктах на его основе в условиях обращенно-фазовой градиентной ВЭЖХ в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Для каждого соединения установлены оптимальные значения энергии соударений и определены интенсивные характеристичные ионы-продукты.

4. Разработан алгоритм обнаружения флавоноидов горянки на основании закономерностей фрагментации, заключающийся в получении тандемных масс-спектров в режиме зависимого сканирования с предварительно установленными значениями нейтральных потерь (m/z 132,0423, 146,0579 и 162,0528, соответствующих отщеплению ксилозного, рамнозного и глюкозного остатков, соответственно).

5. Выбрана процедура подготовки образцов мочи к ВЭЖХ-МС/МС анализу, включающая сорбционное концентрирование на картриджах, заполненных модифицированным полимером стирола, элюирование метанолом и концентрирование элюата в токе азота с последующим перерастворением сухого остатка в подвижной фазе, при этом коэффициент извлечения составляет 93-98%, а матричный фактор, характеризующий влияние матрицы, – 0,94-0,98.

6. Разработанный алгоритм апробирован при обнаружении метаболитов флавоноидов горянки в моче крыс. Выявлены ранее неизвестные метаболиты и предложены их возможные структуры, соответствующие продуктам гидроксирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Xu Z., Feng S., Shen S., Wang H., Yuan M., Liu J., Huang Y., Ding C. The antioxidant activities effect of neutral and acidic polysaccharides from *Epimedium acuminatum* Franch. on *Caenorhabditis elegans* // Carbohydrate Polymers. 2016. V. 144. P. 122–133.
2. Li H.-F., Guan X.-Y., Yang W.-Z., Liu K.-D., Ye M., Sun C., Lu S., Guo D.-A. Antioxidant flavonoids from *Epimedium wushanense* // Fitoterapia. 2012. V. 83. № 1. P. 44–48.
3. Jiang J., Zhao B.-J., Song J., Jia X.-B. Pharmacology and Clinical Application of Plants in *Epimedium* L. // Chinese Herbal Medicines. V. 8. № 1. P. 12–23.
4. Флора СССР. Т. 7. М.:АН СССР. 1937. С. 542–544.
5. Энциклопедический словарь Ф. А. Брокгауза и И. А. Ефрона: Бесцветник. Санкт-Петербург. 1980. С. 1890–1907.
6. Xu H.-B., Huang Z.-Q. Icariin enhances endothelial nitric-oxide synthase expression on human endothelial cells in vitro // Vascular Pharmacology. 2007. V. 47. № 1. P. 18–24.
7. Shen P., Guo B.L., Gong Y., Hong D.Y., Hong Y., Yong E.L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species // Phytochemistry. 2007. V. 68. № 10. P. 1448–1458.
8. Pan Y., Kong L.-D., Li Y.-C., Xia X., Kung H.-F., Jiang F.-X. Icariin from *Epimedium brevicornum* attenuates chronic mild stress-induced behavioral and neuroendocrinological alterations in male Wistar rats // Pharmacol. Biochem. Behav. 2007. V. 87. № 1. P. 130–140.
9. Liu B., Xu C., Wu X., Liu F., Du Y., Sun J., Tao J., Dong J. Icariin exerts an antidepressant effect in an unpredictable chronic mild stress model of depression in rats and is associated with the regulation of hippocampal neuroinflammation // Neuroscience. V. 294. P. 193–205.

10. Li F., Gong Q.-H., Wu Q., Lu Y.-F., Shi J.-S. Icariin isolated from *Epimedium brevicornum Maxim* attenuates learning and memory deficits induced by d-galactose in rats // Pharmacol. Biochem. Behav. 2010. V. 96. № 3. P. 301-305.

11. Wu Y., Li Y., Liu C., Li E., Gao Z., Liu C., Gu W., Huang Y., Liu J., Wang D., Hu Y. Structural characterization of an acidic *Epimedium* polysaccharide and its immune-enhancement activity // Carbohydrate Polymers. V. 138. P. 134-142.

12. Cheng H., Feng S., Shen S., Zhang L., Yang R., Zhou Y., Ding C. Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of *Epimedium acuminatum* Franch. polysaccharide // Carbohydrate Polymers. V. 96. № 1. P. 101–108.

13. Cheng H., Feng S., Jia X., Li Q., Zhou Y., Ding C. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Epimedium acuminatum* // Carbohydrate Polymers. V. 92. № 1. P. 63–68.

14. Chen R., Li S., Liu C., Yang S., Li X. Ultrasound complex enzymes assisted extraction and biochemical activities of polysaccharides from *Epimedium* leaves // Process Biochemistry. V. 47. № 12. P. 2040–2050.

15. Ma H.P., He X.R., Yang Y., Li M.X., Hao D.J. The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review // J. Ethnopharmacol. 2011. V. 134. № 3. P. 519–541.

16. Editorial Committee of Pharmacopoeia of Ministry of Health PR China, The Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1. Beijing: China Chemical Industry Press, 2010. P. 306–308.

17. Huang X., Zhu D.Y., Lou Y.J. A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G1 arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells // Eur. J. Pharmacol. 2007. V. 564. № 1-3. P. 26–36.

18. Humfrey C.D. Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence // Nat. Toxins. 1998. V. 6. № 2. P. 51–59.

19. Felson D.T., Zhang Y., Hannan M.T., Kiel D.P., Wilson P.W., Anderson J.J. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women // *N. Engl. J. Med.* 1993. V. 329. № 16. P. 1141–1146.
20. Guo J., Li F., Wu Q., Gong Q., Lu Y., Shi J. Protective effects of icariin on brain dysfunction induced by lipopolysaccharide in rats // *Phytomedicine.* V. 17. № 12. P. 950–955.
21. Pan Y., Kong L., Xia X., Zhang W., Xia Z., Jiang F. Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005. V. 82. № 4. P. 686–694.
22. Wu J., Du J., Xu C., Le J., Xu Y., Liu B., Dong B. Icariin attenuates social defeat-induced down-regulation of glucocorticoid receptor in mice // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011. V. 98. № 2. P. 273–278.
23. Ji H., Liu K., Li S.P., Gong X.J. Effect of HEF on osteoporosis induced by retinoic acid in male rats // *J. Chin. Pharm. Univ.* 2000. V. 31. № 3. P. 222–225.
24. Meng F., Li Y.B., Xiong Z.L., Jiang Z.M., Li F.M. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum Maxim.* // *Phytomedicine.* 2005. V. 12. № 3. P. 189–193.
25. Xu F., Ding Y., Guo Y., Liu B., Kou Z., Xiao W., Zhu J. Anti-osteoporosis effect of *Epimedium* via an estrogen-like mechanism based on a system-level approach // *J. Ethnopharmacol.* 2016. V. 177. P. 148–160.
26. Ma A., Qi S., Xu D., Zhang X., Daloz P., Chen H. Baohuoside-1, a novel immunosuppressive molecule, inhibits lymphocyte activation in vitro and in vivo // *Transplantation.* 2004. V. 78. № 6. P. 831–838.
27. Yin L.-L., Lin L.-L., Zhang L., Li L. *Epimedium* flavonoids ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in rats by modulating neuroinflammatory and neurotrophic responses // *Neuropharmacology.* V. 63. № 5. P. 851–862.
28. Cai M.L., Ji H., Li P., Wang M.Q. Effects of five flavonoids isolated from *Epimedium pubescens* on osteoblasts in vitro // *Chin. J. Nat. Med.* 2004. V. 2. № 4. P. 235–238.

29. Liu T.Z., Chen C.Y., Yiin S.J., Chen C.H., Cheng J.T., Shih M.K., Wang Y.S., Chern C.L. Molecular mechanism of cell cycle blockage of hepatoma SK-Hep-1 cells by Epimedin C through suppression of mitogen-activated protein kinase activation and increased expression of CDK inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) // *Food Chem. Toxicol.* 2006. V. 44. № 2. P. 227–235.
30. Shen P., Wong S.P., Yong E.L. Sensitive and rapid method to quantify icaritin and desmethylicaritin in human serum using gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 857. № 1. P. 47–52.
31. Li S.P., Zhao J., Yang B. Strategies for quality control of Chinese medicines // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 55. № 4. P. 802–809.
32. Ong E.S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 812. № 1-2. P. 23–33.
33. Huie C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 373. № 1-2. P. 23-30.
34. Zygmunt B., Namiesnik J. Preparation of samples of plant material for chromatographic analysis // *J. Chromatogr. Sci.* 2003. V. 41. № 3. P. 109–116.
35. Wang Y., Guo Z., Jin Y., Zhang X., Wang L., Xue X., Liang X. Identification of prenyl flavonoid glycosides and phenolic acids in *Epimedium koreanum Nakai* by Q-TOF-MS combined with selective enrichment on «click oligo (ethylene glycol)» column // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 51. № 3. P. 606–616.
36. Liu M., Zhao S., Jia J., Shi X., Song J., Wang H., Du Y., Zhang L. Qualitative and quantitative analysis of 15 active constituents in Jiweiling freeze-dried powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 2011. V. 34. № 1. P. 2–17.
37. Wu C.S., Guo B.L., Sheng Y.X., Zhang J.L. Simultaneous determination of seven flavonoids in *Epimedium* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method // *Chinese Chemical Letters.* 2008. V. 19. P. 329–332.

38. Islam N.M., Yoo H.H., Lee M.W., Dong M.S., Park Y.I., Jeong H.S., Kim D. Simultaneous quantitation of five flavonoid glycosides in *Herba Epimedii* by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Phytochem. Anal.* 2008. V. 19. P. 71–77.

39. Chen X.J., Ji H., Zhang Q.W., Tu P.F., Wang Y.T., Guo B.L., Li S.P. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2008. V. 46. № 2. P. 226–235.

40. Xie P.-S., Yan Y.-Z., Guo B.-L., Lam C. W. K., Chui S. H., Yu Q.-X. Chemical pattern-aided classification to simplify the intricacy of morphological taxonomy of *Epimedium* species using chromatographic fingerprinting // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2010. V. 52. № 4. P. 452–460.

41. Xu Y., Li Z., Yuan L., Zhang X., Lu D., Huang H., Wang Y. Variation of Epimedins A–C and Icariin in Ten Representative Populations of *Epimedium brevicornu Maxim.*, and Implications for Utilization // *Chemistry and Biodiversity.* 2013. V. 10. № 4. P. 711–721.

42. Pozharitskaya O. N., Kosman V. M., Shikov A. N., Demchenko D.V., Eschenko A.Y., Makarov V.G. Comparison between HPLC and HPTLC densitometry for the determination of icariin from *Epimedium koreanum* extracts // *J. Sep. Sci.* 2007. V. 30. № 5. P. 708–712.

43. Jin J., Li Y., Tanui E. K., Han L., Jia Y., Zhang L., Wang Y., Zhang X., Zhang Y. Fishing and knockout of bioactive compounds using a combination of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) and preparative HPLC for evaluating the holistic efficacy and interaction of the components of *Herba Epimedii* // *J. Ethnopharmacol.* 2013. V. 147. № 2. P. 357–365.

44. Li Y., Duan J., Guo T., Xie W., Yan S., Li B., Zhou Y., Chen Y. In vivo pharmacokinetics comparisons of icariin, emodin and psoralen from gan-kang granules and extracts of *Herba Epimedii*, *Nepal dock* root, *Ficus hirta yahl* // *J. Ethnopharmacol.* 2009. V. 124. № 3. P. 522–529.

45. Liu R., Li A., Sun A., Cui J., Kong L. Preparative isolation and purification of three flavonoids from the Chinese medicinal plant *Epimedium koreanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1064. № 1. P. 53–57.
46. Dua Q., Xia M., Ito Y. Purification of icariin from the extract of *Epimedium segittatum* using high-speed counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. 2002. V. 962. № 1-2. P. 239–241.
47. Chen X.-J., Ji H., Wang Y.-T., Li S.-P. Simultaneous determination of seven flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and capillary electrochromatography // J. Sep. Sci. 2008. V. 31. № 4. P. 881–887.
48. Zhang H.-F., Yang T.-S., Li Z.-Z., Wang Y. Simultaneous extraction of epimedin A, B, C and icariin from *Herba Epimedii* by ultrasonic technique // Ultrasonics Sonochemistry. 2008. V. 15. № 4. P. 376–385.
49. Lu Y., Wu H., Tian Y., Cheng Y., Qi R., Wu Y., Zhang S. Development and Validation of Nonaqueous Capillary Electrophoresis Method for Simultaneous Estimation of Icariin, Icariside II, and Epimedin K in *Epimedium* Leaves // Analytical Letters. 2010. V. 43. № 15. P. 2381–2389.
50. Chen Y.F., Feng Y., Hong S.Z., Zhu S.H. Study on water extraction process of *Herba Epimedii* with microwave technology // China Journal of Chinese Materia Medica. 2005. V. 20. P. 1625–1626.
51. Hemwimol S., Pavasant P., Shotipruk A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* // Ultrasonics Sonochemistry. 2006. V. 13. № 6. P. 543–548.
52. Chen X.J., Guo B.L., Li S.P., Zhang Q.W., Tu P.F., Wang Y.T. Simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1163. № 1-2. P. 96–104.
53. Galema S.A. Microwave Chemistry // Chem. Soc. Rev. 1997. V. 26. № 3. P. 233-238.

54. Cao Z.Y., Ge H.C., Lai S.L. Studies on synthesis and adsorption properties of chitosan cross-linked by glut araldehyde and Cu(II) as template under microwave irradiation // *Eur. Polym. J.* 2001. V. 37. № 10. P. 2141–2143.

55. Shao J., Yang Y.M., Zhong Q.Q. Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative treatment under microwave irradiation // *Polym. Degrad. Stab.* 2003. V. 82. № 3. P. 395–398.

56. Kan H., Yue Y., Guo L.-N. Microwave-assisted hydrolyzation of the flavonoids in *Epimedium koreamum Nakai* // *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 2014. V. 37. № 15. P. 2091–2101.

57. Li P., Qi L.W., Liu E.H., Zhou J.L. Wen X.D. Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models // *Trends Anal. Chem.* 2008. V. 27. № 1. P. 66–77.

58. Liu Y., Zhou J.L., Liu P., Sun S., Li P. Chemical markers fishing and knockout for holistic activity and interaction evaluation of the components in herbal medicines // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. № 32. P. 5239–5245.

59. Hui D.Y. Utility and importance of gene knockout animals for nutritional and metabolic research // *J. Nutr.* 1998. V. 128. № 11. P. 2052–2057.

60. Zhu L., Li B., Liu X., Huang G., Meng X. Purification of six lignans from the stems of *Schisandra chinensis* by using high-speed counter-current chromatography combined with preparative high-performance liquid chromatography // *Food Chemistry.* 2015. V. 186. P. 146–152.

61. Zhang Y., Liu C., Qi Y., Li Y., Li S. Dynamic ultrasonic-assisted extraction coupled with paralleled counter-current chromatography for continuous extraction and online isolation of xanthenones from *Garcinia mangostana* // *Separation and Purification Technology.* 2015. V. 144. P. 215–222.

62. Zhang Q., Wang Z., Chou G. Preparative separation of four alkaloids from *Gelsemium elegans* by high-speed counter-current chromatography // *Chinese Herbal Medicines.* 2015. V. 7. № 3. P. 267–272.

63. Li H.B., Chen F., Zhang T.Y., Yang F.Q., Xu G.Q. Preparative isolation and purification of lutein from the *Microalga Chlorella Vulgaris* by high-speed

counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. 2001. V. 905. № 1-2. P. 151–155.

64. Han Q.B., Wong L., Yang N.Y., Song J.Z., Qiao C.F., Yiu H., Ito Y., Xu H.X. A simple method to optimize the HSCCC two-phase solvent system by predicting the partition coefficient for target compound // J. Sep. Sci. 2008. V. 31. № 6-7. P. 1189-1194.

65. Lu Y.B., Sun C.R., Pan Y.J. A comparative study of upright counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography for preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Magnoliae officinalis* // J. Sep. Sci. 2006. V. 29. № 3. P. 351–357.

66. Li H.B., Chen F. Preparative isolation and purification of chuanxiongine from the medicinal plant *Ligusticum chuanxiong* by high-speed counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1047. № 2. P. 249-253.

67. Chen L.J., Games D.E., Jones J. Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. 2003. V. 988. № 1. P. 95–105.

68. Li H.B., Chen F. Simultaneous separation and purification of five bioactive coumarins from the Chinese medicinal plant *Cnidium monnieri* by high-speed counter-current chromatography // J. Sep. Sci. 2005. V. 28. № 3. P. 268-272.

69. Walasek M., Grzegorzczak A., Malm A., Skalicka-Wozniak K. Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography // Food Chemistry. 2015. V. 186. P. 133–138.

70. Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1065. № 2. P. 145-168.

71. Li H.B., Chen F. Preparative isolation and purification of phillyrin from the medicinal plant *Forsythia suspensa* by high-speed counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. V. 1083. № 1-2. P. 102–105.

72. Aman R., Carle R., Conrad J., Beifuss U., Schieber A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1074. № 1-2. P. 99–105.

73. Li H.B., Fan K.W., Chen F. Isolation and purification of canthaxanthin from the microalga *Chlorella zofingiensis* by high-speed counter-current chromatography // J. Sep. Sci. 2006. V. 29. № 5. P. 699–703.

74. Liang J, Meng J, Guo M, et al. Conical coils counter-current chromatography for preparative isolation and purification of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza Bunge* // J Chromatogr A. 2013. V. 1288. P. 35–39.

75. Lu Y.B., Sun C.R., Pan Y.J. Isolation and purification of oridonin from *Rabdosia rubescens* using upright counter-current chromatography // J. Sep. Sci. 2006. V. 29. № 2. P. 314–318.

76. Li H.-B., Chen F. Separation and purification of epimedin A, B, C, and icariin from the medicinal Herb *Epimedium brevicornum Maxim* by dual-mode HSCCC // J. Chromatogr. Sci. 2009. 47. N 5. P. 337–340.

77. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография). Т. 1. 1988. 203 с.

78. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография). Т. 2. 1988. 175 с.

79. Hahn-Deinstrop E. Applied Thin-Layer Chromatography. Wiley. 2007. 41p.

80. Reich E., Widmer V. Thin Layer Chromatography, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley. 2012. 186 p.

81. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Т. 1. Москва. 2010. 704 с.

82. Chen G., Zhang H., Ye J. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection // Analytica Chimica Acta. 2000. V. 423. № 1. P. 69–76.

83. Cherkaoui S., Bekkouche K., Christen P., Veutheyet J.L. Non-aqueous capillary electrophoresis with diode array and electrospray mass spectrometric

detection for the analysis of selected steroidal alkaloids in plant extracts // J. Chromatogr. A. 2001. V. 922. № 1-2. P. 321–328.

84. Chu I., Bodnar J. A., White E. L., Bowman R.N. Quantification of vinblastine and vincristine in *Catharanthus roseus* plant by capillary zone electrophoresis // J. Chromatogr. A. 1996. V. 755. № 2. P. 281–288.

85. Guo B.-Y., Wen B., Shan X.-Q., Zhang S.Z., Lin J.M. Separation and determination of phospholipids in plant seeds by nonaqueous capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1074. № 1-2. P. 205–213.

86. Lochmann H., Bazzanella A., Kropsch S., Bächmann K. Determination of tobacco alkaloids in single plant cells by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 2001. V. 917. № 1-2. P. 311–317.

87. Arlt K., Brandt S., Kehr J. Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection // J. Chromatogr. A. 2001. V. 926. № 2. P. 319–325.

88. Olsson J., Claesson K., Karlberg B., Nordström A.C. Determination of indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl aspartic acid in pea plant with capillary electrophoresis and fluorescence detection // J. Chromatogr. A. 1998. V. 824. № 2. P. 231–239.

89. Hurtado-Fernandez E., Gomez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A., Fernandez-Gutierrez A. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2010. V. 53. № 5. P. 1130–1160.

90. Falkova M.T., Bulatov A.V., Pushina M.O., Ekimov A.A., Alekseeva G.M., Moskvina L.N. Multicommutated stepwise injection determination of ascorbic acid in medicinal plants and food samples by capillary zone electrophoresis ultraviolet detection // Talanta. 2015. V. 133. P. 82–87.

91. Yin X.F., Li Z., Zhang S.H., Wu C.X., Wang C., Wang Z. Determination of strychnine and brucine in traditional Chinese medicine preparations by capillary zone electrophoresis with micelle to solvent stacking // Chinese Chemical Letters. 2011. V. 22. № 3. P. 330–333.

92. Tian K., Zhang H., Chen X., Hu Z. Determination of five anthraquinones in medicinal plants by capillary zone electrophoresis with β -cyclodextrin addition // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1123. № 1. P. 134–137.

93. Rovio S., Simolin H., Koljonen K., Siren H. Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1185. № 1. P. 139–144.

94. Хомов Ю.А., Фомин А.Н. Разработка и валидация методики определения артикаина в моче капиллярным электрофорезом («Капель – 105») // Современные проблемы науки и образования: Эл. журнал. 2012. № 5.

95. Неудачина Л.К., Лебедева Е.Л., Кузнецов А.О. Применение капиллярного зонного электрофореза для определения содержания меди в чае // Химия растительного сырья. 2011. № 4. С. 161–167.

96. Li Y., Xiong Z., Li F. Determination of epimedin C in rat plasma by reversed-phase high-performance chromatography after oral administration of *Herba Epimedii* extract // J. Chromatogr. B. 2005. V. 821. № 2. P. 235–239.

97. Liu J.J., Li S.P., Wang Y.T. Optimization for quantitative determination of four flavonoids in *Epimedium* by capillary zone electrophoresis coupled with diode array detection using central composite design // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1103. № 2. P. 344–349.

98. Chai Y., Ji S., Zhang G., Wu Y., Yin X., Liang D., Xu Z. Determination of icariin in Chinese traditional medicine by capillary zone electrophoresis // Biomed. Chromatogr. 1999. V. 13. № 5. P. 373–375.

99. Eeltink S., Rozing G.P., Kok W.T. Recent applications in capillary electrochromatography // Electrophoresis. 2003. V. 24. № 22-23. P. 3935-3961.

100. Vanhoenacker G., Bosch T.V.D., Rozing G., Sandra P. Recent applications of capillary electrochromatography // Electrophoresis. 2001. V. 22. № 19. P. 4064-4103.

101. Eeltink S., Kok W.T. Recent applications in capillary electrochromatography // Electrophoresis. 2006. V. 27. № 1. P. 84–96.

102. Dermaux A., Sandra P. Applications of capillary electrochromatography // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. № 15-16. P. 3027–3065.

103. Yang F.Q., Li S.P., Li P., Wang Y.T. Optimization of CEC for simultaneous determination of eleven nucleosides and nucleobases in *Cordyceps* using central composite design // *Electrophoresis*. 2007. V. 28. № 11. P. 1681–1688.

104. Li P., Li S. P., Yang F. Q., Wang Y.T. Simultaneous determination of four tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* by pressurized liquid extraction and capillary electrochromatography// *J. Sep. Sci.* 2007. V. 30. № 6. P. 900–905.

105. Chen X.J., Zhao J., Meng Q., Li S.P., Wang Y.T. Simultaneous determination of five flavonoids in licorice using pressurized liquid extraction and capillary electrochromatography coupled with peak suppression diode array detection // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. № 43. P. 7329–7335.

106. Lu H., Wang J., Wang X., Lin X., Wu X., Xie Z. Rapid separation and determination of structurally related anthraquinones in *Rhubarb* by pressurized capillary electrochromatography // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2007. V. 43. № 1. P. 352–357.

107. Chen Y., Fan G., Chen B., Xie B., Xie Y., Wu H., Wu Y., Yan C., Wang J. Separation and quantitative analysis of coumarin compounds from *Angelica dahurica* (*Fisch. ex Hoffm*) *Benth. et Hook.* by pressurized capillary electrochromatography // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2006. V. 41. № 1. P. 105-116.

108. Fonseca F.N., Tavares M.F.M., Horvath C. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita* // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1154. № 1-2. P. 390–399.

109. Маерле К. В. Сверхсшитый полимер на основе винилпиридина в качестве стационарной фазы в капиллярной электрохроматографии. Дис. канд. хим. наук. Москва. 2009. 112 с.

110. Zhang L., Zhang J., Wang H., Zhang L., Zhang W., Zhang Y. Analysis of flavonoids in leaves of *Adinandra nitida* by capillary electrochromatography on

monolithic columns with stepwise gradient elution // J. Sep. Sci. 2005. V. 28. № 8. P. 774–779.

111. Fonseca F.N., Tavares M.F.M., Horvath C. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita* // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1154. № 1. P. 390–399.

112. Vanhoenacker G., Dermaux A., Keukeleire D. D., Sandra P. Single-run capillary electrochromatographic analysis of hop acids and prenylated hop flavonoids // J. Sep. Sci. 2001. V. 24. № 1. P. 55–58.

113. Jemmali Z., Chartier A., Dufresne C., Elfakir C. Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography–mass spectrometry analysis in plant extracts // Talanta. 2016. V. 147. P. 35–43.

114. Topolewska A., Czarnowska K., Halinski L.P., Stepnowski. Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography // J. Chromatogr. B. 2015. V. 990. P. 150–157.

115. Farajzadeh M.A., Nouri N., Khorram P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography // TrAC Trends in Analytical Chemistry. V. 55. P. 14–23.

116. Chen Y.-Z., Kao S.-Y., Jian H.-C., Yu Y.-M., Li J.-Y., Wang W.-H., Tsai C.-W. Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry // J. Food and Drug Analysis. V. 23. № 4. P.636–644.

117. Andrasi N., Helenkar A., Zaray G., Vasanits A., Molnar-Perl I. Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: Analysis of dissolved steroids in wastewater samples // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. № 14. P. 1878–1890.

118. Xie G.-X., Qiu Y.-P., Qiu M.-F., Gao X.-F., Liu Y.-M., Jia W. Analysis of dencichine in *Panax notoginseng* by gas chromatography–mass spectrometry

with ethyl chloroformate derivatization // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2007. V. 43. № 3. P. 920-925.

119. De Rijke E., Out P., Niessen W.M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A. Analytical separation and detection methods for flavonoids // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1112. № 1-2. P. 31–63.

120. Кочетова М.В., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии // Успехи химии. 2007. 76. № 1. С. 88-100.

121. Куркин В.А., Гриненко Н.А., Запесочная Г.Г. ТСХ-и ВЭЖХ-анализ сирингина в *Syringa vulgaris* II // Химия природн. соед. 1992. № 1. С. 45–49.

122. Дубичев А.Г., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Воронцов Е.Д. Изучение химического состава корневищ *Rhodiola rosea* методом ВЭЖХ // Химия природн. соед. 1991. № 2. С.188–193.

123. Сенцов М.Ф., Браславский В.Б., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Бакулин В.Т., Правдивцева О.Е. Сравнительное исследование компонентного состава почек некоторых видов *Populus L.* методом ВЭЖХ // Раст. Ресурсы. 1997. 33. № 2. С. 51-55.

124. Сенцов М.Ф., Браславский В.Б., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Исследование химического состава почек *Populus laurifolia Ledeb* // Раст. ресурсы. 1996. Т. 32. № 1-2. С. 100–105.

125. Иващенко Н.В., Самылина И.А., Лапшихина А.А. Изучение полифенольного комплекса лоха узколистного, произрастающего в России // Фармация. 2014. № 7. С. 16–19.

126. Naseer S., Lone S.H., Lone J.A., Khuroo M.A., Bhat K.A. LC–MS guided isolation, quantification and antioxidant evaluation of bioactive principles from *Epimedium elatum* // J. Chromatogr. B. 2015. V. 989. P. 62–70.

127. Zhao H.-Y., Sun J.-H., Fan M.-X. Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1190. № 1. P. 157-181.

128. Quan Q.-M., Wu W., Li Y.-X., Cai Q.-R. Variation in icariin and flavonoid contents of Barrenwort species // J. Medicinal Plants Research. 2010. V. 4. № 12. P. 1176–1181.

129. Wang L., Wang X., Kong L. Automatic authentication and distinction of *Epimedium koreanum* and *Epimedium wushanense* with HPLC fingerprint analysis assisted by pattern recognition techniques // Biochemical Systematics and Ecology. 2012. V. 40. P. 138–145.

130. Zhao H., Fan M., Fan L., Sun J., Guo D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of metabolites in rats after administration of prenylflavonoids from *Epimediums* // J. Chromatogr. B. 2010. V. 878. № 15-16. P. 1113–1124.

131. Jin Y., Wu C.-S., Zhang J.-L., Li Y.-F. A new strategy for the discovery of *Epimedium* metabolites using high-performance liquid chromatography with high resolution mass spectrometry // Analytica Chimica Acta. 2013. V. 768. P. 111-117.

132. Huang D., Yang J., Lu X., Deng Y., Xiong Z., Li F. An integrated plasma and urinary metabonomic study using UHPLC–MS: intervention effects of *Epimedium koreanum* on «Kidney-Yang Deficiency syndrome» rats // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2013. V. 76. P. 200-206.

133. Xu W., Zhang Y., Yang M., Shen Z., Zhang X., Zhang W., Li H. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2007. V. 45. № 4. P. 667-672.

134. Qian Q., Li S.-L., Sun E., Zhang K.-R., Tan X.-B., Wei Y.-J., Fan H.-W., Cui L., Jia X.-B. Metabolite profiles of icariin in rat plasma by ultra-fast liquid chromatography coupled to triple-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2012. V. 66. № 4. P. 392-398.

135. Liu M., Liu H., Lu X., Li C., Xiong Z., Li F. Simultaneous determination of icariin, icariside II and osthole in rat plasma after oral administration of the extract of *Gushudan* (a Chinese compound formulation) by LC–MS/MS // J. Chromatogr. B. 2007. V. 860. № 1. P. 113–120.

136. Zhang Y.-P., Xu W., Li N., Li H.-Y., Shen Z.-Y., Zhang X.-M., Yang M., Zhang W.-D., Zhang C. LC-MS-MS method for simultaneous determination of icariin and its active metabolite icariside II in human plasma // Chromatogr. 2008. V. 68. P. 245-250.

137. Wong S.P., Shen P., Lee L., Li J., Yong E.L. Pharmacokinetics of prenylflavonoids and correlations with the dynamics of estrogen action in sera following ingestion of a standardized *Epimedium* extract // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2009. V. 50. № 2. P. 216-223.

138. Shen P., Wong S.P., Li J., Yong E.L. Simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of five *Epimedium* prenylflavonoids in rat sera // J. Chromatogr. B. 2009. V. 877. № 1-2. P. 71–78.

139. Hu Y.M., Wang Y.T., Sze S.C.W., Tsang K.W., Wong H.K., Liu Q., Zhong L.D., Tong Y. Identification of the major chemical constituents and their metabolites in rat plasma and various organs after oral administration of effective Erxian Decoction (EXD) fraction by liquid chromatography-mass spectrometry // Biomed. Chromatogr. 2010. V. 24. № 5. P. 479–489.

140. Pozharitskaya O.N., Karlina M.V., Shikov A.N., Kosman V.M., Makarova M.N., Makarov V.G. Determination of icariin in rat plasma by reverse-phase high-performance liquid chromatography after oral administration of a lipid-based suspension of *Epimedium koreanum* extract // Biomed. Chromatogr. 2008. V. 22. № 6. P. 625–629.

141. Tu Y., Zhu L., Wang G., Zhao L., Xiang B. Development and validation of a LC–ESI–MS assay for determination of icariin in rat plasma after administration of *Herba Epimedii* // Chromatogr. 2008. V. 67. № 7-8. P. 591–597.

142. Yang W., Yu X.-C., Chen X.-Y., Zhang L., Lu C.-T., Zhao Y.-Z. Pharmacokinetics and tissue distribution profile of icariin propylene glycol-liposome intraperitoneal injection in mice // *J. Pharmacy and Pharmacology*. 2012. V. 64. № 2. P. 190–198.

143. Zhang S.-Q. Biodistribution evaluation of icaritin in rats by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Ethnopharmacology*. 2014. V. 155. P. 1382–1387.

144. Chang Q., Wang G.-N., Li Y., Zhang L., You C., Zheng Y. Oral absorption and excretion of icaritin, an aglycone and also active metabolite of prenylflavonoids from the Chinese medicine *Herba Epimedii* in rats // *Phytomedicine*. 2012. V. 19. P. 1024–1028.

145. Liu J., Lou Y.J. Determination of icariin and metabolites in rat serum by capillary zone electrophoresis: rat pharmacokinetic studies after administration of icariin // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. V. 36. № 2. P. 365–370.

146. Wu C., Zhang J., Zhou T., Guo B., Wang Y., Hou J. Simultaneous determination of seven flavonoids in dog plasma by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to a bioequivalence study of bioactive components in *Herba Epimedii* and Er-Xian Decoction // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 54. № 1. P. 186–191.

147. Lu Y., Li N., Deng Y., Zhao L., Guo X., Li F., Xiong Z. Simultaneous determination of icariin, naringin and osthole in rat plasma by UPLC–MS/MS and its application for pharmacokinetic study after oral administration of Gushudan capsules // *J. Chromatogr. B*. 2015. V. 993-994. P. 75–80.

148. Li Z.H., Alex D., Siu S.O., Chu I.K., Renn J., Winkler C., Lou S., Tsui S.K.-W., Zhao H.Y., Yan W.R., Mahady G.B., Li G.H., Kwan Y.W., Wang Y.T., Lee S.M.-Y. Combined in vivo imaging and omics approaches reveal metabolism of icaritin and its glycosides in zebrafish larvae // *Molecular BioSystems*. 2011. V. 7. P. 2128–2138.

149. Gong Y., Yip S.C., Thamarai S.K., Zhang J., Lee H.K., Yong E.L. Trace analysis of icariin in human serum with dansyl chloride derivatization after

oral administration of Epimedium decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2007. V. 860. № 2. P. 166–172.

150. Варфоломеев С., Гуревич К. Биокинетика. М.: ФАИР-ПРЕСС. 1999. 716 с.

151. Калетина Н. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2005. 1010 с.

152. Плетнева Т., Соломатин Е., Сыроешкин А. Токсикологическая химия. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2005. 512 с.

153. Куценко С.А. Основы токсикологии. М.: Фолиант. 2004. 570 с.

154. Веселовская Н., Коваленко А., Папазов И. Наркотики. М.: Нарконт. 2002. 232 с.

155. Hu C., Xu G. Metabolomics and traditional Chinese medicine // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 61. P. 207–214.

156. Vaclavik L., Krynitsky A.J., Rader J.I. Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-highperformance liquid chromatography–quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. 2014. Vol. 810. P. 45–60.

157. Tian F., Gu L., Si A., Yao Q., Zhang X., Zhao J., Hu D. Metabolomic study on the faecal extracts of atherosclerosis mice and its application in a Traditional Chinese Medicine // *J. Chromatogr. B*. 2015. V. 1007. P. 140–148.

158. Lu C., Deng J., Li L., Wang D., Li G. Application of metabolomics on diagnosis and treatment of patients with psoriasis in traditional Chinese medicine // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. V. 1844. № 1. Part B. P. 280–288.

159. Zhu M., Zhang H., Humphreys W.G. Drug Metabolite profiling and identification by high-resolution mass spectrometry // *J. Biological Chemistry*. V. 286. № 29. P. 25419–25425.

160. Wang X., Sun H., Zhang A., Sun W., Wang P., Wang Z. Potential role of metabolomics approaches in the area of traditional Chinese medicine: As

pillars of the bridge between Chinese and Western medicine // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 55. № 5. P. 859–868.

161. Ma S.G., Zhu M.S. Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites // *Chem. Biol. Interact.* 2009. V. 179. № 1. P. 25–37.

162. Zhu M.S., Zhang D.L., Zhang H.Y., Shyu W.C. Integrated strategies for assessment of metabolite exposure in humans during drug development: analytical challenges and clinical development considerations // *Biopharm. Drug Dispos.* 2009. V. 30. № 4. P. 163–184.

163. Ruan Q., Peterman S., Szewc M.A., Ma L., Cui D., Humphreys W.G., Zhu M.S. An integrated method for metabolite detection and identification using a linear ion trap/ Orbitrap mass spectrometer and multiple data processing techniques: application to indinavir metabolite detection // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 2. P. 251–261.

164. Zhu M.S., Ma L., Zhang H.Y., Humphreys W.G. Detection and structural characterization of glutathione-trapped reactive metabolites using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. № 21. P. 8333–8341.

165. Zhang H.Y., Zhang D.L., Ray K., Zhu M.S. Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2009. V. 44. № 7. P. 999–1016.

166. Ferrer I., Thurman E.M. Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/ quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 19. P. 8161–8168.

167. Lim H.K., Chen J., Cook K., Sensenhauser C., Silva J., Evans D.C. A generic method to detect electrophilic intermediates using isotopic pattern triggered data-dependent high-resolution accurate mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. V. 22. № 8. P. 1295–1311.

168. Cuyckens F., Balcaen L.I.L., De Wolf K., De Samber B., Van Looveren C., Hurkmans R., Vanhaecke F. Use of the bromine isotope ratio in

HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS analysis of a new drug in development // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. № 7. P. 1717–1729.

169. Zhang H.Y., Yang Y. An algorithm for thorough background subtraction from high-resolution LC/MS data: application for detection of glutathione-trapped reactive metabolites // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 9. P. 1181–1190.

170. Zhang H.Y., Ma L., He K., Zhu M.S. An algorithm for thorough background subtraction from high-resolution LC/MS data: application to the detection of troglitazone metabolites in rat plasma, bile, and urine // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 9. P. 1191-1200.

171. Castro-Perez J.M. Current and future trends in the application of HPLC-MS to metabolite-identification studies // *Drug Discov. Today.* 2007. V. 12. № 5-6. P. 249-256.

172. Weber R.J.M., Southam A.D., Sommer U., Viant M.R. Characterization of isotopic abundance measurements in high resolution FT-ICR and Orbitrap mass spectra for improved confidence of metabolite identification // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. № 10. P. 3737–3743.

173. Ye L.-H., Bing-xin Xiao B.-X., Cao F.-R., Zheng Y., Pan R.-I, Chang Q. Identification of Icaritin Metabolites in Rats by LC-MS/MS // *Chinese Herbal Medicines.* 2015. V. 7. № 4. P. 296–302.

174. Wu C., Sheng Y., Zhang Y., Zhang J., Guo B. Identification and characterization of active compounds and their metabolites by high-performance liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry after oral administration of a herbal extract of *Epimedium koreanum* Nakai to rats // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. V. 22. № 18. P. 2813-2824.

175. Dikunets M.A., Appolonova S.A., Rodchenkov G.M. The matrix effect on determination of synthetic corticosteroids and diuretics by HPLC method with tandem mass spectrometry // *Rus. J. Phys. Chem.* 2009. V. 83. № 4. P. 1–8.

176. Korfmacher W.A. Using mass spectrometry for drug metabolism studies. N.Y. etc: CRC. 2005. 270 p.

177. Могилюк В., Добровольный А. Сверхкритическая флюидная экстракция растительного сырья: перспективная технологическая платформа для фармацевтической промышленности // Фармацевтическая отрасль. 2015. Т. 48. № 1. С. 62–68.

178. Покровский О. Пробоподготовка в химическом анализе методом сверхкритической флюидной экстракции // Аналитика. 2013. Т. 6. № 13. С. 22-27.

179. Боголицын К.Г. Перспективы применения сверхкритических флюидных технологий в химии растительного сырья // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2007. Т. 2. № 1. С. 16–27.

180. Водяник А.Р., Шадрин А.Ю., Синев М.Ю. Сверхкритическая флюидная экстракция природного сырья: мировой опыт и ситуация в России // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2008. Т. 3. № 2. С. 58–69.

181. Алиев А.М., Степанов Г.В. Исследование влияния давления на процесс сверхкритической экстракции биологически активных веществ из растительного сырья // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2006. Т. 1. № 1. С. 101-105.

182. Глазков И.Н., Ревельский И.А., Кузякин С.В., Кузнецов М.П., Богданов А.А., Мартынов А.А., Ефимов И.П., Золотов Ю.А. Сверхкритическая флюидная экстракция и её применение для определения ультрамалых содержаний органических веществ в различных средах // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2006. Т. 1. № 1. С. 52-65.

183. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2013. [электронный ресурс] // сайт.[http:// www.fda.gov/downloads/drugs/guidancescompliance/regulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancescompliance/regulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf) (дата обращения 12.09.2015).

184. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные

положения и определения. Введ. 1 ноября 2002. М.: Госстандарт России. 2002. 32 с.

185. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. Введ. 1 ноября 2002. М.: Госстандарт России. 2002. 42 с.

186. Батрак Г.Е., Кудрин А.Н.. Дозирование лекарственных средств экспериментальным животным. М.: Медицина. 1979. 167 с.

187. Жердев В.П., Литвин А.А.. Роль и организация фармакокинетических исследований // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2005. № 2. С. 10-13.

188. Степанов Н.Ф. Квантовая механика и квантовая химия. М.: Мир. 2001. 519 с.

189. Mizuno M., Iinuma M., Tanaka T., Sakakibara N., Nishi M., Inada A., Nakanishi T. A flavonol glycoside from *Epimedium Diphyllum* // Phytochemistry. 1989. V. 28. № 9. P. 2527–2529.

190. Zhong J.-D., Zhou C., Li H.-M., Li R.-T. A new furan flavonol glycoside from *Epimedium koreanum* // Chinese Herbal Medicines. 2014. V. 6. № 2. P. 168-170.

191. Guo B.-L., Li W.-K., Yu J.-G., Xiao P.-G. Brevicornin, a flavonol from *Epimedium Brevicornum* // Phytochemistry. 1996. V. 41. № 3. P. 991–992.

192. Yamamoto H., Kimata J., Senda M., Inoue K. Dimethylallyl diphosphate: kaempferol 8-dimethylallyl transferase in *Epimedium Diphyllum* cell suspension cultures // Phytochemistry. 1997. V. 44. № 1. P. 23–28.

193. Mizuno M., Iinuma M., Tanaka T., Sakakibara N., Fujikawa T., Hanioka S., Ishida Y., Liu X.-S., Murata H. Flavonol glycosides in the roots of *Epimedium Diphyllum* // Phytochemistry. 1988. V. 27. № 11. P. 3645–3647.

194. Mizuno M., Sakakibara N., Hanioka S., Iinuma M., Tanaka T., Liu X.-S., Shi D.-W. Flavonol glycosides from *Epimedium Sagittatum* // Phytochemistry. 1988. V. 27. № 11. P. 3641–3643.

195. Mizuno M., Hanioka S., Suzuki N., Inuma M., Tanaka T., Xin-Shun L., Zhi-Da M. Flavonol glycosides from *Epimedium Sagittatum* // *Phytochemistry*. 1987. V. 26. № 3. P. 861–863.
196. Li W.-K., Xiao P.-G., Tu G.-Z., Ma L.-B., Zhang R.-Y. Flavonol glycosides from *Epimedium Koreanum* // *Phytochemistry*. 1995. V. 38. № 1. P. 263–265.
197. Li Y.-S., Liu Y.-L. Flavonol glycosides from *Epimedium Wushanense* // *Phytochemistry*. 1990. V. 29. № 10. P. 3311–3314.
198. Mizuno M., Inuma M., Tanaka T., Sakakibara N., Fujikawa T., Hanioka S., Ishida Y., Liu X.-S., Murata H. Flavonol glycosides in the roots of *Epimedium Diphyllum* // *Phytochemistry*. 1988. V. 27. № 11. P. 3645–3647.
199. Fukai T., Nomura T. Seven prenylated flavonol glycosides from two *Epimedium* species // *Phytochemistry*. 1988. V. 27. № 1. P. 259–266.
200. Ito Y., Hirayama F., Suto K., Sagara K., Yoshida T. Three flavonol glycosides from *Epimedium Koreanum* // *Phytochemistry*. 1988. V. 27. № 3. P. 911–913.
201. Yu C.Y., Song L.N., Chen G. Two new prenylflavonoids from *Epimedium Sutchuenense* // *Chinese Chemical Letters*. 2009. V. 20. P. 842–844.
202. Севко Д.А., Беклемишев М.К., Родин И.А., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Аксёнов А.В., Митрофанов Д.А. Изучение фитостероидного профиля экстракта серпухи венценосной (*Serratula coronata*) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения // *Масс-спектрометрия*. 2015. Т. 12. № 4. P. 177–183.
203. Чернова Е.Н., Русских Я.В., Подольская Е.П., Жаковская З.А., Царев В.С., Кухарева Г.И. Оптимизация параметров масс-спектрометрического анализа цианотоксинов на гибридном хромато-масс-спектрометре LTQ ORBITRAP XL (Thermo Finnigan) // *Научное приборостроение*. 2013. Т. 23. № 1. С. 20–29.

204. Comstock K., Huang Y. Multiple fragmentation methods for small molecule characterization on a dual pressure linear ion trap Orbitrap hybrid mass spectrometer. San Jose: Thermo Fisher Scientific. 2013. 540 p.

205. Отто М. Современные методы аналитической химии: пер. с нем. под ред. А.В. Гармаша. Т. 2. М.: Техносфера. 2003. 281 с.

206. Сычёв К.С. Подготовка пробы в газовой и жидкостной хроматографии. М.: КОКОРО. 2012. 160 с.

207. Taylor P. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry // Clin. Biochem. 2005. V. 38. P. 328–334.

208. Xu R., Fan L., Rieser M., El-Shourbagy T. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. V. 44. № 2, P. 342–355.

209. Hernandez F., Sancho J., Pozo O. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples // Anal. Bioanal. Chem. 2005. V. 382. № 4. P. 934-946.

210. Kebarle P., Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase – the mechanism of electrospray mass spectrometry // Anal. Chem. 1993. V. 65. № 22. P. 972A–986A.

211. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2000. V. 11. № 11. P. 942–950.

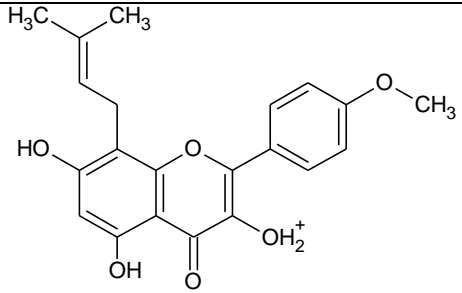
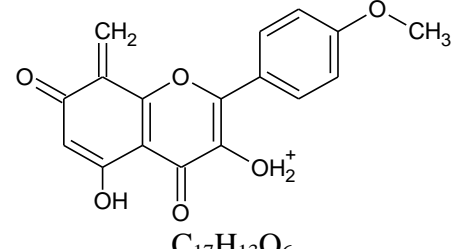
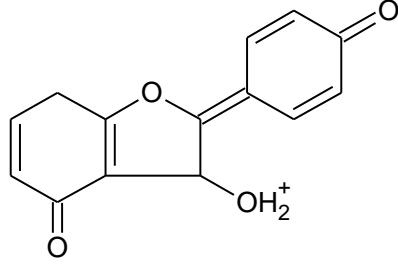
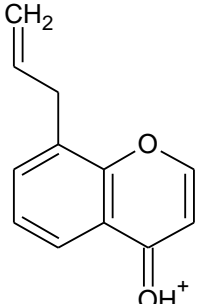
212. Sterne J.L., Johnston M.V., Nicol G.R., Ridge D.P. Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples // J. Mass Spectrom. 2000. V. 35. № 3. P. 385–391.

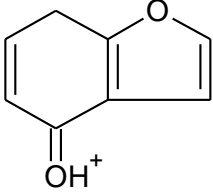
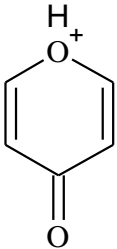
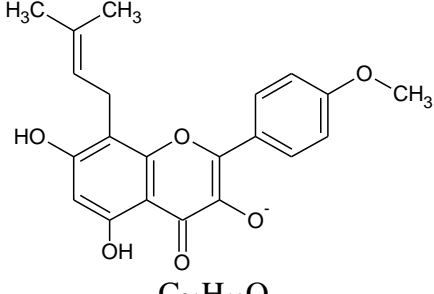
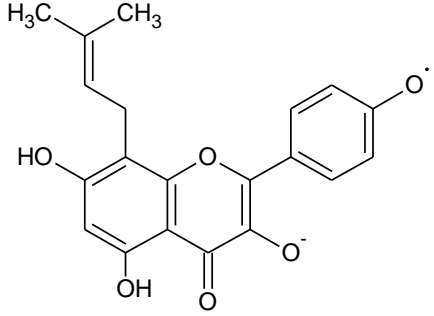
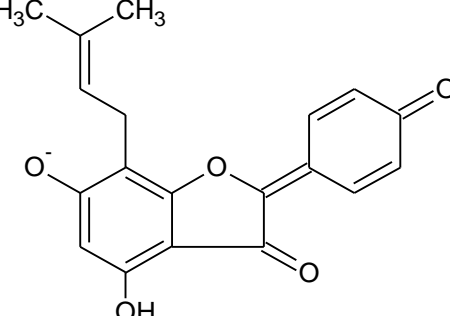
213. Bonfiglio R., King R.C., Olah T.V., Merkle K. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1999. V. 13. № 12. P. 1175–1185.

214. Ярошенко Д.В. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии. Дис. канд. хим. наук. Санкт-Петербург. 2014. 153 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А.

Таблица А1 – Точные массы и предполагаемые структуры фрагментных ионов икариина, полученные при различных энергиях соударения

Предполагаемая структура, брутто-формула иона	Теоретическое (измеренное) значение моноизотопной массы, Да; погрешность определения масс, м. д.	I _{отн} , % при соответствующей энергии столкновений, В						
		10	20	30	40	50	60	70
В режиме регистрации положительно заряженных ионов								
 <chem>C21H21O6</chem>	369,1333 (369,1330); 0,8	100	100	100	35	–	–	–
 <chem>C17H13O6</chem>	313,0707 (313,0703); 1,3	–	–	25	100	100	100	10 0
 <chem>C14H11O4</chem>	243,0652 (243,0649); 1,2	–	–	–	–	–	8	34
 <chem>C12H11O2</chem>	187,0754 (187,0752); 1,1	–	–	–	–	–	6	46

Предполагаемая структура, брутто-формула иона	Теоретическое (измеренное) значение моноизотопной массы, Да; погрешность определения масс, м. д.	I _{отн} , % при соответствующей энергии столкновений, В						
		10	20	30	40	50	60	70
 C ₈ H ₇ O ₂ ⁺	135,0441 (135,0440); 0,8	–	–	–	–	–	10	76
 C ₅ H ₅ O ₂ ⁺	97,0284 (97,0288); 4,1	–	–	–	–	–	14	42
В режиме регистрации отрицательно заряженных ионов								
 C ₂₁ H ₁₉ O ₆ ⁻	367,1187 (367,1185); 0,5	–	60	100	90	20	–	–
 C ₂₀ H ₁₆ O ₆ ⁻	352,0952 (352,0952); 0	–	–	–	100	100	80	20
 C ₁₉ H ₁₅ O ₅ ⁻	323,0925 (323,0925); 0	–	–	–	36	80	100	94

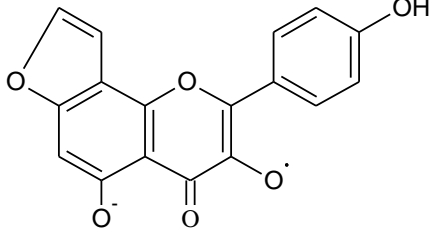
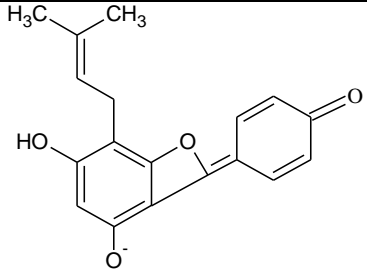
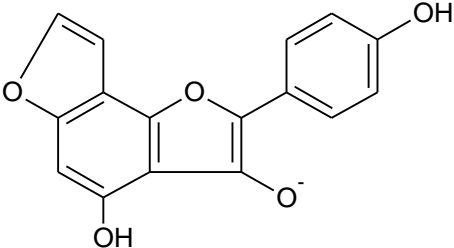
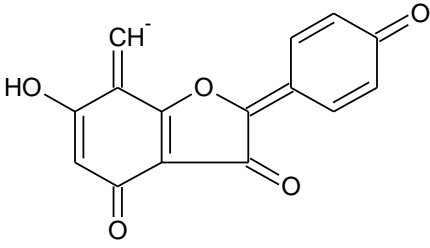
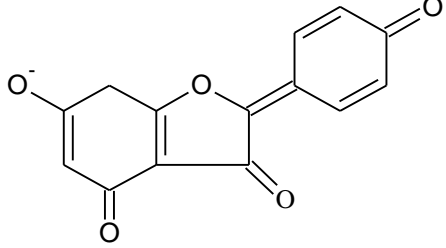
Предполагаемая структура, брутто-формула иона	Теоретическое (измеренное) значение моноизотопной массы, Да; погрешность определения масс, м. д.	I _{отн} , % при соответствующей энергии столкновений, В						
		10	20	30	40	50	60	70
 <chem>C17H8O6</chem>	308,0326 (308,0328); 0,6	-	-	-	-	-	34	36
 <chem>C18H15O4</chem>	295,0976 (295,0973); 1,0	-	-	-	-	-	28	48
 <chem>C16H9O5</chem>	281,0456 (281,0456); 0	-	-	-	-	-	34	98
 <chem>C15H7O5</chem>	267,0299 (267,0298); 0,4	-	-	-	-	-	44	100
 <chem>C14H7O5</chem>	255,0299 (255,0298); 0,4	-	-	-	-	-	18	38



Рис. А1. Свидетельство об аттестации методики измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии



АКТ

о практическом применении результатов диссертационного исследования Шевляковой О.А. на тему «Определение флавоноидов горянки и их метаболитов методом тандемной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения»

Настоящим актом удостоверяется, что в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научный центр «Сигнал» используется способ измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии, предложенный в диссертационном исследовании Шевляковой О.А.

Разработанная в рамках данного диссертационного исследования методика измерений содержания аттестована и внесена в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» органом по аккредитации ОАО ФНТЦ «Инверсия».

Начальник Испытательной химико-аналитической
лаборатории ФГУП «НЦ «Сигнал»



В.Ф. Таранченко

Рис. А2. Акт внедрения методики измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии в ФГУП «НЦ «Сигнал».

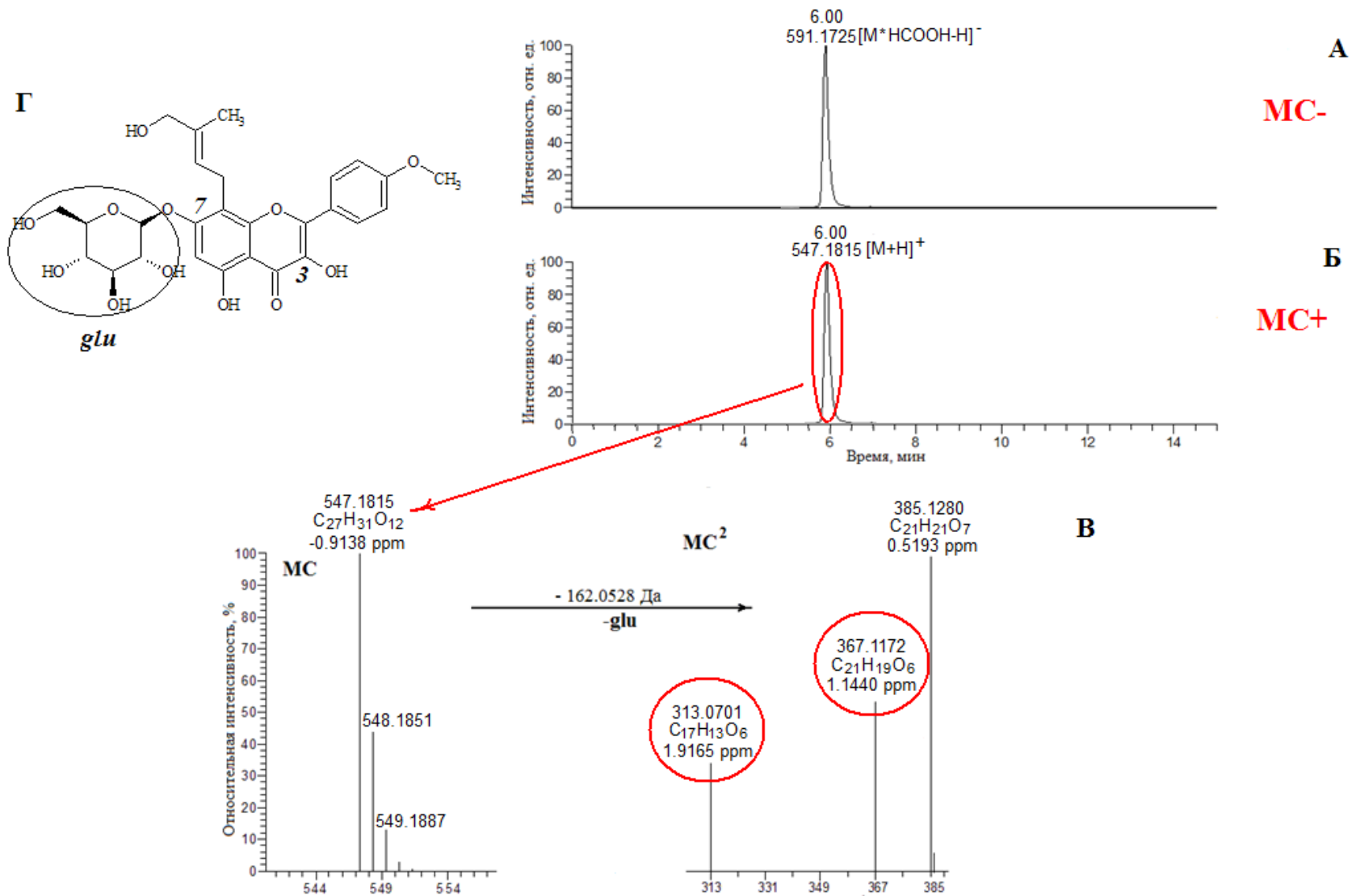


Рис. А3. Хроматограмма пробы мочи: по выделенному иону с m/z 591,1719 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (А), по выделенному иону с m/z 547,1810 в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Б); МСⁿ-спектры соединения со временем выхода 6,00 мин (В); возможная структура метаболита М2 (Г).

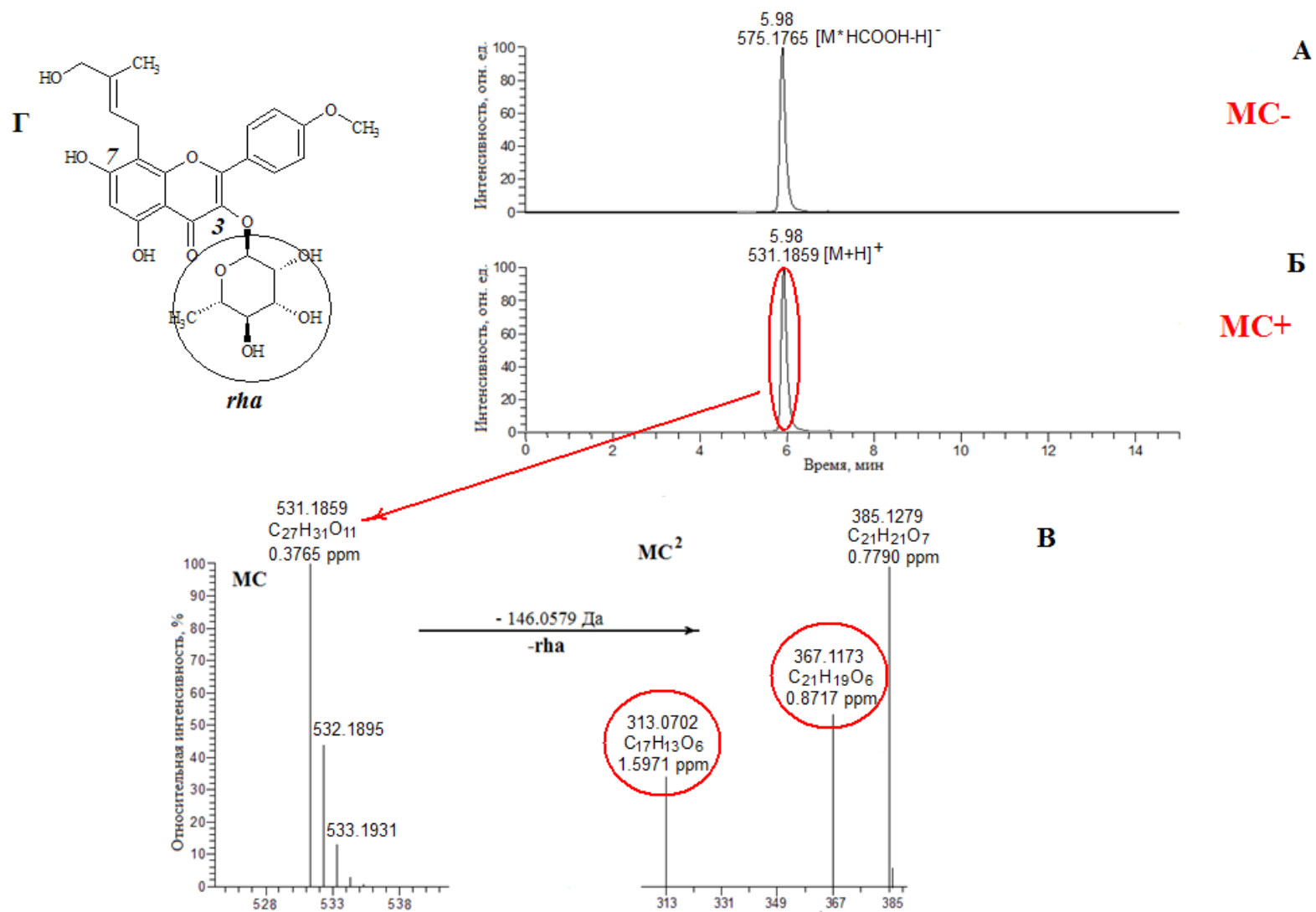


Рис. А4. Хроматограмма пробы мочи: по выделенному иону с m/z 575,1770 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (А), по выделенному иону с m/z 531,1861 в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Б); MS^n -спектры соединения со временем выхода 5,98 мин (В); возможная структура метаболита М3 (Г).

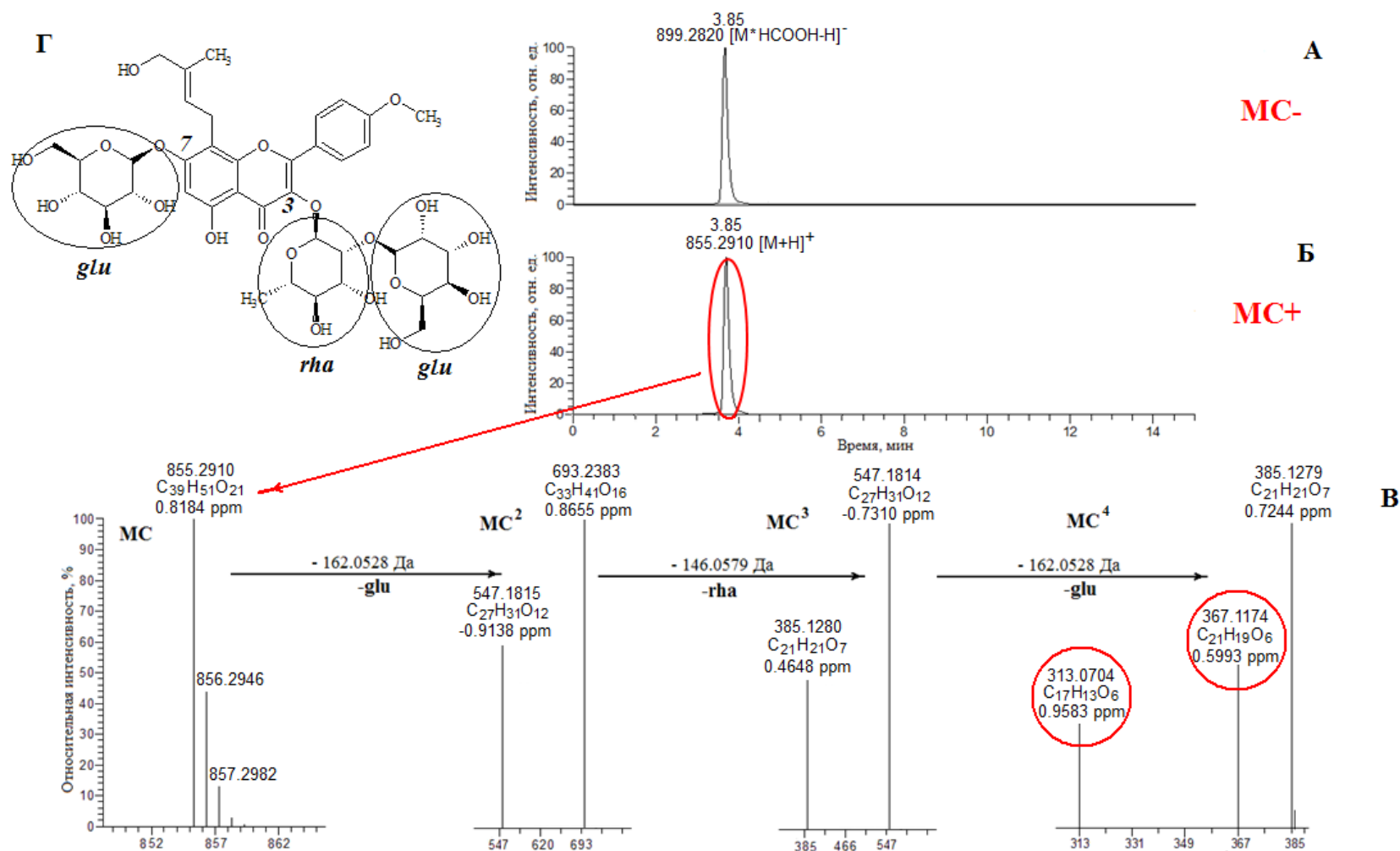


Рис. А5. Хроматограмма пробы мочи: по выделенному иону с m/z 899,2827 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (А), по выделенному иону с m/z 855,2917 в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Б); MSⁿ-спектры соединения со временем выхода 3,85 мин (В); возможная структура метаболита М4 (Г).

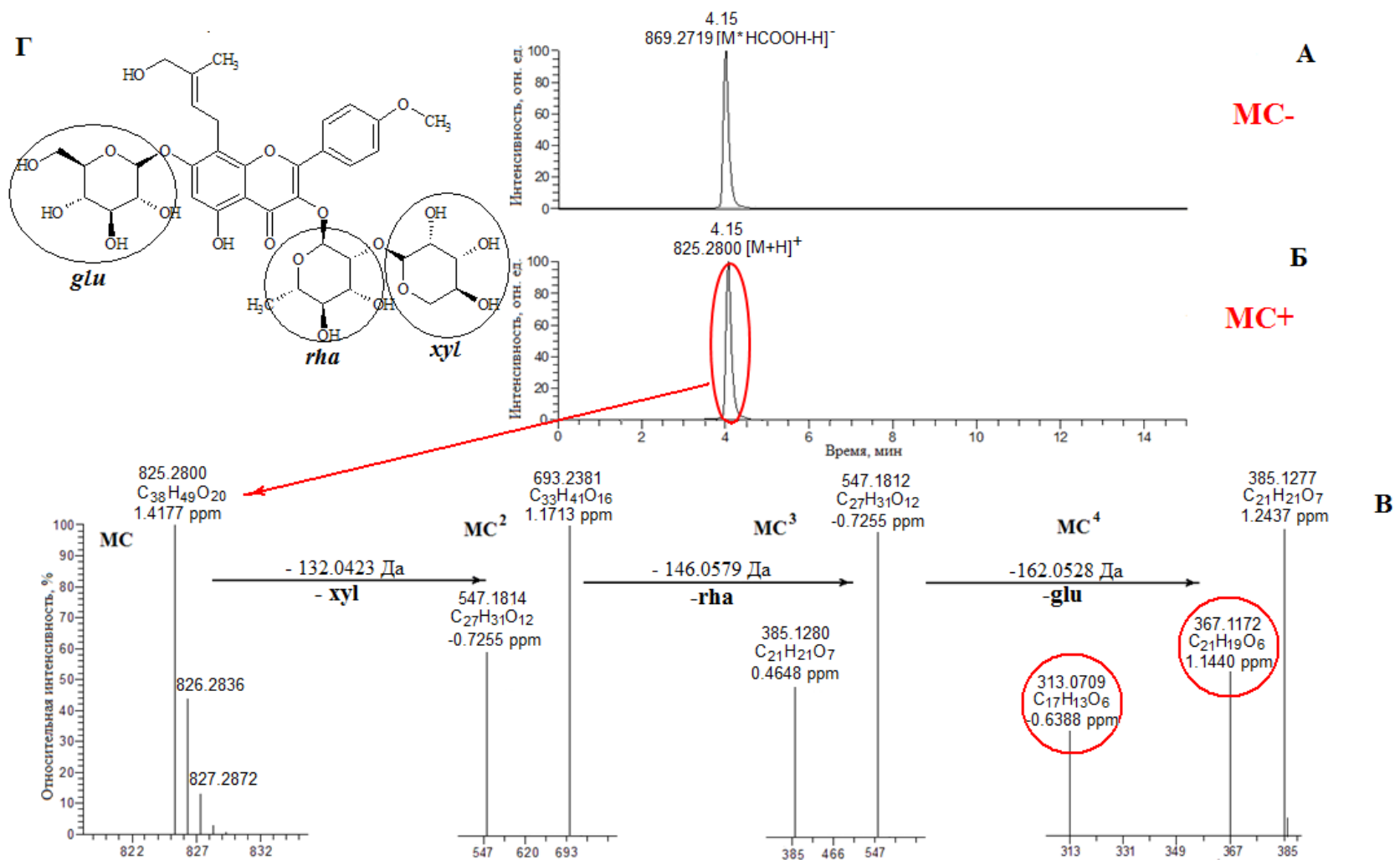


Рис. А6. Хроматограмма пробы мочи: по выделенному иону с m/z 869,2721 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (А), по выделенному иону с m/z 825,2812 в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Б); MC^n -спектры соединения со временем выхода 4,15 мин (В); возможная структура метаболита М5 (Г).

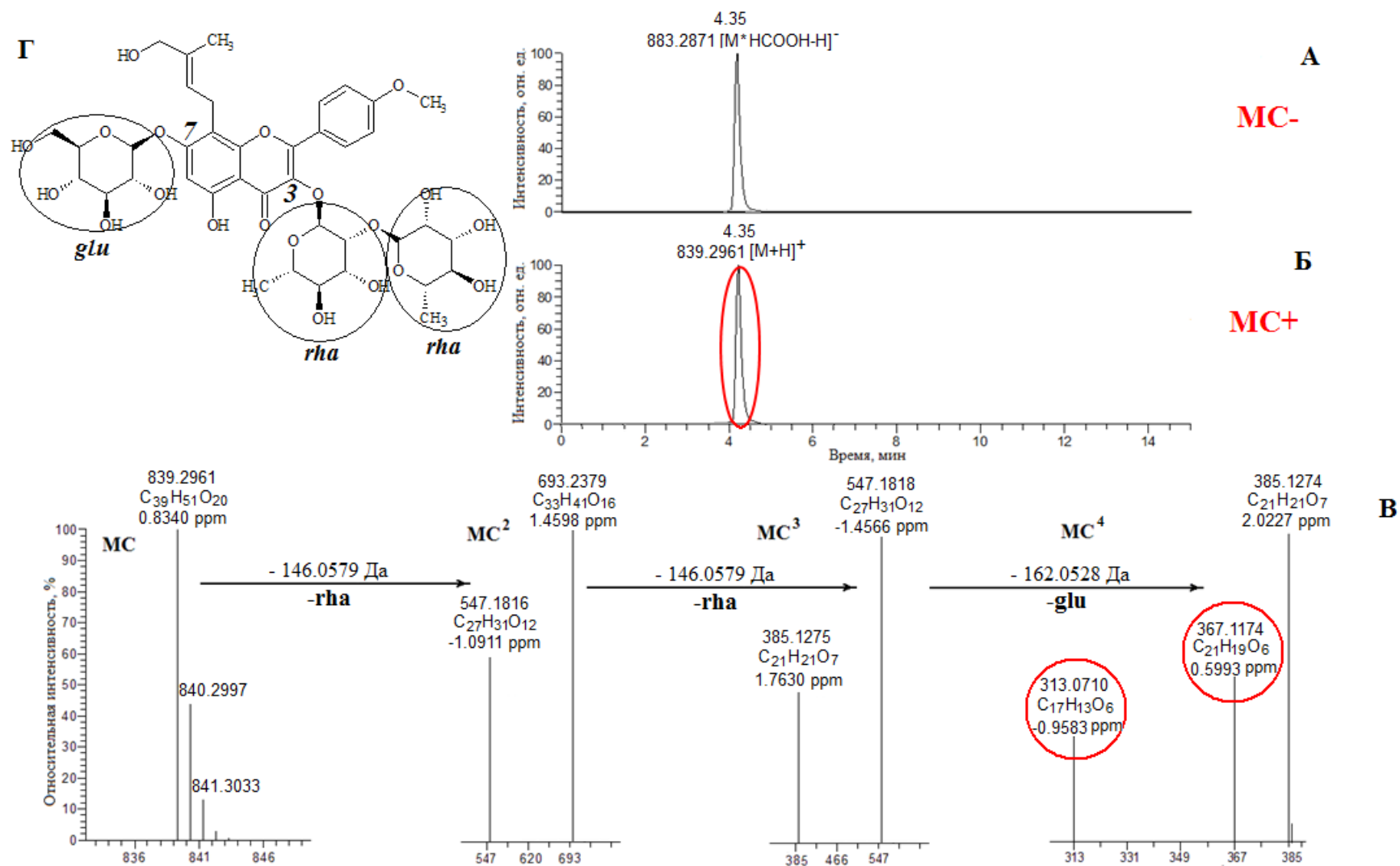


Рис. А7. Хроматограмма пробы мочи: по выделенному иону с m/z 883,2877 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (А), по выделенному иону с m/z 839,2968 в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Б); MC^n -спектры соединения со временем выхода 4,35 мин (В); возможная структура метаболита М6 (Г)

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ
ИКАРИИНА, ИКАРИТИНА, ИКАРИЗИДА I, ИКАРИЗИДА II,
ЭПИМЕДИНА А, ЭПИМЕДИНА В И ЭПИМЕДИНА С
В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Методика измерений № 2-28-2016

Москва 2016

Методика измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии

Procedure for measurements of concentrations of icariin, icaritin, icariside I, icariside II, epimedin A, epimedin B and epimedin C in dietary supplements by high performance liquid chromatography method with tandem mass spectrometry

1 Назначение и область применения

Настоящая методика устанавливает порядок и способы измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C в биологически активных добавках в диапазоне от 0,1 до 50,0 мг в капсуле (флаконе) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемной масс-спектрометрии.

Методика измерений разработана и рекомендуется для оценки количественного содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C в биологически активных добавках при проведении химико-аналитического контроля качества препаратов.

2 Нормативные ссылки

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями нормативных документов:

ГОСТ Р 1.5-2012 «Стандартизация в РФ. Стандарты национальные. Правила построения, изложения, оформления и обозначения»;

ГОСТ Р 8.563-2009 «ГСИ. Методики (методы) измерений»;

ГОСТ Р 12.1.019-2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты»;

ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений ч. 1-6»;

ГОСТ 12.0.004-90 «Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения»;

ГОСТ 12.1.004-91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования»;

ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны»;

ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности»;

ГОСТ 12.4.009-83 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание»;

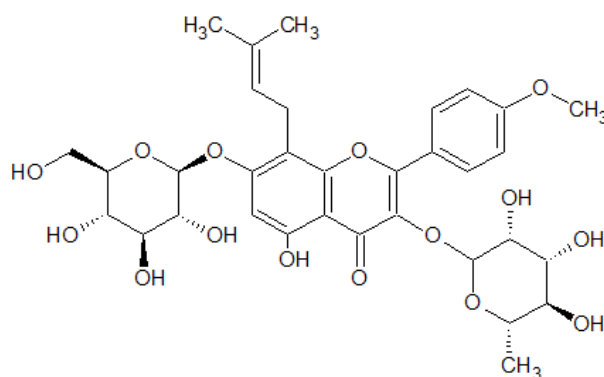
РМГ 60-2003 «ГСИ. Смеси аттестованные. Общие требования к разработке»;

РМГ 61-2010 «ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки»;

РМГ 76-2004 «ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа».

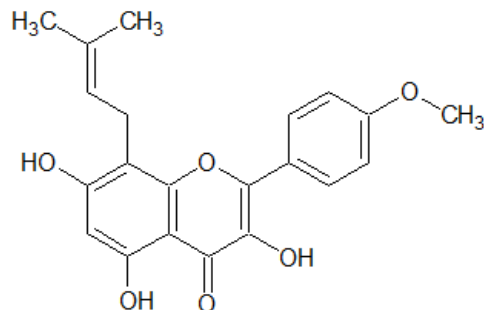
3 Физико-химические свойства

Икариин – брутто-формула $C_{33}H_{40}O_{15}$, молекулярная моноизотопная масса 676,2367 а.е.м. CAS № 489-32-7. Структурная формула



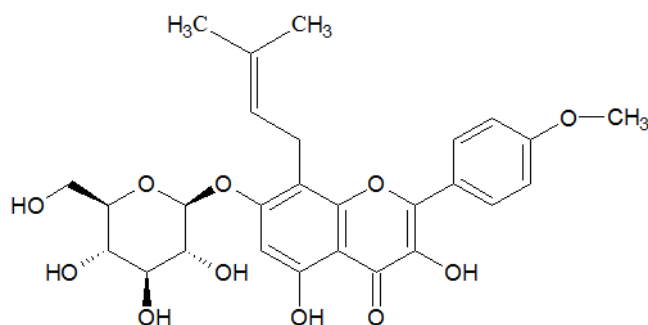
По агрегатному состоянию икариин представляет собой белый порошок.

Икаритин – брутто-формула $C_{21}H_{20}O_6$, молекулярная моноизотопная масса 368,1260 а.е.м. CAS № 118525-40-9. Структурная формула



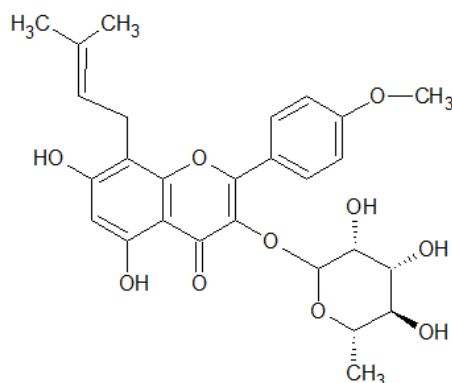
По агрегатному состоянию икаритин представляет собой белый кристаллический порошок.

Икаризид I – брутто-формула $C_{27}H_{30}O_{10}$, молекулярная моноизотопная масса 530,1788 а.е.м. CAS № 56725-99-6. Структурная формула



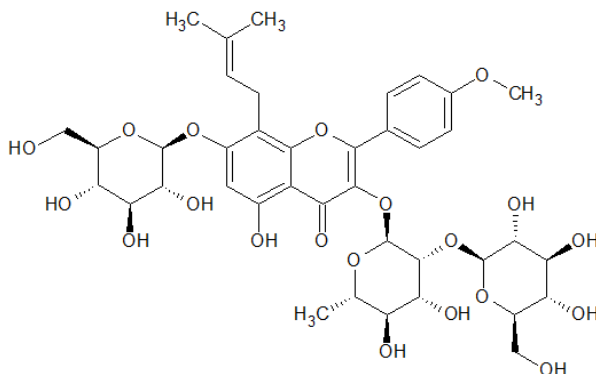
По агрегатному состоянию икаризид I представляет собой белый кристаллический порошок.

Икаризид II – брутто-формула $C_{27}H_{30}O_{10}$, молекулярная моноизотопная масса 514,1839 а.е.м. CAS № 113558-15-9. Структурная формула



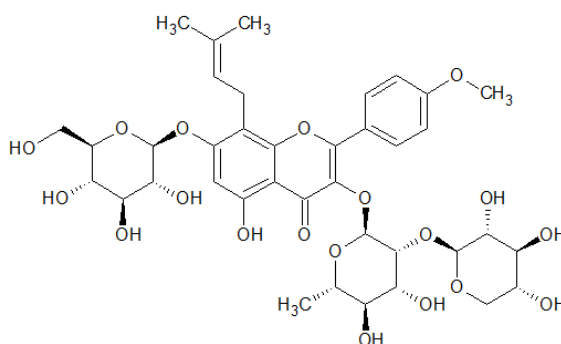
По агрегатному состоянию икаризид II представляет собой белый кристаллический порошок.

Эпимедин А – брутто-формула $C_{39}H_{50}O_{20}$, молекулярная моноизотопная масса 838,2895 а.е.м. CAS № 110623-72-8. Структурная формула



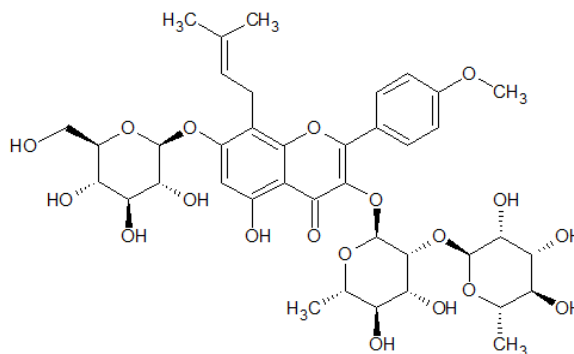
По агрегатному состоянию эпимедин А представляет собой белый кристаллический порошок.

Эпимедин В – брутто-формула $C_{38}H_{48}O_{19}$, молекулярная моноизотопная масса 808,2790 а.е.м. CAS № 110623-73-9. Структурная формула



По агрегатному состоянию эпимедин В представляет собой белый кристаллический порошок.

Эпимедин С – брутто-формула $C_{39}H_{50}O_{19}$, молекулярная моноизотопная масса 822,2946 а.е.м. CAS № 110642-44-9. Структурная формула



По агрегатному состоянию эпимедин С представляет собой белый кристаллический порошок.

4 Требования к выполнению аналитических исследований

При выполнении анализа соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 15 до 28 °С;
- атмосферное давление от 84,0 до 106,7 кПа;
(от 630 до 800 мм.рт.ст.);
- относительная влажность воздуха от 45 до 80 %.

Эксплуатацию средств измерений проводят в условиях, приведенных в руководстве по эксплуатации.

5 Характеристика погрешности измерений

Границы относительной погрешности измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемного масс-спектрометрического детектирования при доверительной вероятности $P=0,95$ не должны превышать $\pm 17\%$.

6 Метод измерений

6.1 Измерения выполняют методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемного масс-спектрометрического детектирования в режиме ионизации

электростатическим распылением и регистрации положительно заряженных ионов.

Измерение содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках проводят путем:

– экстрагирования икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С из содержимого капсулы (флакона) метанолом;

– фильтрования полученного экстракта;

– разделения экстракта на хроматографической колонке с последующим масс-спектрометрическим определением характеристик целевых компонентов в режиме мониторинга селективных реакций (SRM);

– регистрации сигнала детектора в цифровой форме с последующей обработкой с использованием ЭВМ.

6.2 Для количественного определения содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением тандемного масс-спектрометрического детектирования используется метод абсолютной калибровки. Идентификация соединений осуществляется по соответствию времени удерживания и масс-спектральным характеристикам, полученным по градуировочным и анализируемым растворам.

Время анализа одной пробы с учетом пробоподготовки не превышает 1,5 ч.

7 Средства измерений, вспомогательные устройства и технические средства, посуда, реактивы и материалы

7.1 Средства измерений

7.1.1 Жидкостной хроматограф модели UltiMate 3000RS «Dionex» фирмы «Thermo Scientific», с насосом, встроенным дегазатором,

оборудованный системой автоматического ввода пробы, с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения Q Exactive фирмы «Thermo Scientific» с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении (класс точности 1, диапазон измерения 50 - 2000 а.е.м., значения СКО по времени удерживания и по площади хроматографического пика не превышают 10 % и 5 % соответственно). Хроматографическая колонка HYPERSIL Gold aQ длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 3 мкм. ЭВМ Dell фирмы «Dell electronics» с программным обеспечением для сбора и обработки данных XCalibur, версия 2.2.

7.1.2 Весы лабораторные электронные XP Analytical модель XP-56 с погрешностью взвешивания $\pm 0,000001$ г и диапазоном взвешивания от 0,00001 до 52,0 г, производства компании «Mettler Toledo», Швейцария.

7.1.3 Дозатор механический с варьируемым объемом дозирования (0,1 - 1,0) мл, предел точности $\pm (2,0...0,6)$ %, ООО «Biohit», Финляндия, кат. № 720060.

7.1.4 Дозатор механический с варьируемым объемом дозирования (1,0 - 5,0) мл, предел точности $\pm (2,0...0,5)$ %, ООО «Biohit», Финляндия, кат. № 720110.

7.1.5 Цилиндр 1-50-1 ГОСТ 1770-74.

7.1.6 Цилиндр 1-1000-1 ГОСТ 1770-74.

7.1.7 Дозатор механический с варьируемым объемом дозирования (0,01 - 0,10) мл, предел точности $\pm (3,0...0,8)$ % производства компании «Sartorius Biohit Liquid Handling», Финляндия, кат. № 720050.

7.2 Вспомогательные устройства

7.2.1 Шкаф сушильный типа SNOL 67/350, диапазон автоматического регулирования температур (50-350) °С, ООО «СНОЛ-ТЕРМ».

7.2.2 Ванна ультразвуковая «Серьга» УЗМ 001 ТУ СУР 3.836.007, Россия.

7.2.3 Холодильник бытовой с морозильной камерой по ГОСТ 16317-87, Россия.

7.2.4 Аквадистиллятор электрический, тип ДЭ-4-2М, ТУ 64-1-721-79, Россия.

7.2.5 Установка для получения деионизованной воды NANOPure фирмы «Thermo Scientific», США.

7.2.6 Центрифуга низкоскоростная Eppendorf 5702, обеспечивающая максимальную скорость вращения до 4400 об/мин, Германия, кат. № 5702 000.019.

7.2.7 Орбитальный шейкер MS 3 basic, с максимальной скоростью вращения 3000 об/мин производства фирмы «IKA», Германия, кат. № 3617000.

7.2.8 Фильтровальные насадки на шприц Spartan диаметром 30 мм с размером пор 0,20 мкм производства фирмы «Whatman», кат. № 9.049 941.

7.2.9 Шприц Spartan вместимостью 10 мл производства фирмы «Whatman», кат. № REF 309604.

7.2.10 Упариватель-концентратор на 6 портов производства фирмы «Supelco», кат. № 22971, США.

7.3 Посуда

7.3.1 Вials стеклянные с герметично завинчивающимися крышками вместимостью 15 мл¹ фирмы «Supelco», США, кат. № 27161.

7.3.2 Вials стеклянные с герметично завинчивающимися крышками вместимостью 2 мл фирмы «Supelco», США, кат. № 27029-U.

7.3.3 Шпатель металлический из нержавеющей стали 150x5 мм, Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Германия, кат. № 1110221.

7.3.4 Стаканчик для взвешивания СВ-19/9 ГОСТ 1770-74.

¹В соответствии с международной системой единиц (СИ) внесистемная единица «литр» (л) допускается к применению наравне с кубическим дециметром (дм³), а также кратные и дольные от неё единицы объёма - «миллилитр» (мл), «микролитр» (мкл) и т.п.

7.3.5 Бутыль вместимостью 1000 мл фирмы «Kavalier», Чехия, кат. № 2070/М.

7.4 Реактивы и материалы

7.4.1 Метиловый спирт (метанол) для ВЭЖХ производства компании «Merck», Германия, кат. № 1.06018.2500.

7.4.2 Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

7.4.3 Азот газообразный, осч, марки А, ТУ 51-940-80.

7.4.4 Икариин – стандартный образец с содержанием основного вещества не менее 95,0 %, производства компании «PhytoLab», кат. № 89714.

7.4.5 Икаритин – стандартный образец с содержанием основного вещества не менее 95,0 %, производства компании «PhytoLab», кат. № 80478.

7.4.6 Икаризид I – стандартный образец с содержанием основного вещества не менее 95,0 %, производства компании «PhytoLab», кат. № 83316.

7.4.7 Икаризид II – стандартный образец с содержанием основного вещества не менее 95,0 %, производства компании «PhytoLab», кат. № 83286.

7.4.8 Эпимедин А – стандартный образец с содержанием основного вещества не менее 95,0 %, производства компании «PhytoLab», кат. № 80586.

7.4.9 Эпимедин В – стандартный образец с содержанием основного вещества не менее 95,0 %, производства компании «PhytoLab», кат. № 80587.

7.4.10 Эпимедин С – стандартный образец с содержанием основного вещества не менее 95,0 %, производства компании «PhytoLab», кат. № 80588.

7.4.11 Калий двуххромовокислый, ч., ГОСТ 4220-75.

7.4.12 Кислота серная концентрированная ($\rho=1,84$ кг/л), х.ч., ГОСТ 4204-77.

7.4.13 Картриджи для твердофазной экстракции HLB вместимостью 6 мл с массой сорбента 200 мг производства компании «Supelco», США, кат. № 54183-U.

7.4.14 Ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ производства компании «Panreac», США, кат. № 221881.1611.

7.4.15 Муравьиная кислота «для ВЭЖХ» 98 %, производства компании «Fluka», кат. № 56302-1L.

7.4.16 Вода деионизованная, ГОСТ Р 52501-2005.

Примечания

1 Средства измерений должны быть внесены в Госреестр СИ РФ и поверены в установленные сроки, иметь клеймо и/или свидетельство о поверке.

2 Реактивы и материалы должны иметь паспорта или сертификаты, подтверждающие их пригодность.

3 Допускается применение других средств измерений, вспомогательных устройств, посуды, реактивов и материалов с метрологическими и техническими характеристиками не хуже, чем у приведенных в разделе 6.

8 Требования к квалификации операторов

К выполнению работ допускают лиц, имеющих квалификацию химика-аналитика или техника-аналитика, прошедших производственное обучение, проверку знаний и практический опыт работы в химических лабораториях с реактивами и лекарственными препаратами и не имеющих медицинских противопоказаний.

9 Требования безопасности и охраны окружающей среды

9.1 При выполнении измерений соблюдают требования техники безопасности при проведении работ с вредными веществами по ГОСТ 12.1.007-76.

9.2 Требования техники безопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-2009.

9.3 Требования организации обучения работающих технике безопасности по ГОСТ 12.0.004-2009.

9.4 Помещения для выполнения измерений должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, обеспечивающей требуемую кратность обмена воздуха на рабочих местах. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005-88.

9.5 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и быть оборудованным средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

9.6 Нормирование по оценке световой среды осуществляется по отраслевому базовому документу СНиП 23-05-95 «Естественное и искусственное освещение».

9.7 При установке, монтаже и эксплуатации хроматографической системы следует соблюдать ПБ 03-576-03 «Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением».

9.8 Исполнители должны быть проинструктированы по лабораторной инструкции о мерах техники безопасности и допущены к проведению работ.

9.9 Производственные отходы и градуировочные растворы собираются в специальные емкости и уничтожаются установленным порядком.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Осушка и очистка газов

Для очистки газов, используемых при анализе, применяют фильтры, рекомендованные руководством по эксплуатации масс-спектрометра.

10.2 Подготовка посуды

Посуда, используемая для приготовления растворов и аналитических измерений, замачивается на (3-4) часа в свежеприготовленном 3 %-ном растворе двухромовокислого калия (7.4.11) в серной кислоте (7.4.12) (5 г двухромовокислого калия на 100 мл концентрированной серной кислоты). Далее отмывается в проточной воде с последующим многократным ополаскиванием дистиллированной водой (7.4.2), полученной при помощи

аквадистиллятора (7.2.4). После высушивания в сушильном шкафу (7.2.1) при температуре 150 °С посуду следует хранить герметично закрытой без доступа влаги.

10.3 Приготовление растворов и буферов

Любые растворы и субстанции перед взвешиванием или разбавлением необходимо довести до комнатной температуры.

После приготовления растворов на бутылки наклеивают этикетки с наименованием раствора, концентрацией и датой приготовления.

10.3.1 Приготовление подвижной фазы

Для проведения хроматографического анализа используется двухкомпонентная подвижная жидкая фаза:

– компонент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в смеси деионизованной воды с ацетонитрилом марки «для ВЭЖХ» в соотношении компонентов 95:5 (объем.);

– компонент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле марки «для ВЭЖХ».

Для приготовления 0,1 % раствора муравьиной кислоты в смеси деионизованной воды с ацетонитрилом (в соотношении компонентов 95:5 объем.) в мерный цилиндр емкостью 1000 мл (7.1.6) вносят 500 мл деионизованной воды (7.4.16). Далее дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0 - 5,0) мл (7.1.4) вносят 1,0 мл муравьиной кислоты (7.4.15) и, с использованием мерного цилиндра объемом 50,0 мл (7.1.5), вносят 50,0 мл ацетонитрила марки «для градиентной ВЭЖХ» (7.4.14) и доводят до метки 1000 мл деионизованной водой (7.4.16). Приготовленный раствор переливают в бутылку вместимостью 1000 мл (7.3.5), плотно закрывают крышкой и тщательно перемешивают.

Для приготовления 0,1 % раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле в бутылку вместимостью 1000 мл (7.3.5) мерным цилиндром вместимостью

1000 мл (7.1.6) вносят 700 мл ацетонитрила марки «для градиентной ВЭЖХ» (7.4.14). Далее дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) вносят 1,0 мл муравьиной кислоты (7.4.15), и, с использованием мерного цилиндра вместимостью 1000 мл (7.1.6), вносят 300,0 мл ацетонитрила марки «для градиентной ВЭЖХ» (7.4.14), раствор плотно закрывают крышкой и тщательно перемешивают.

Срок хранения приготовленных растворов при температуре $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ не более семи дней.

10.3.2 Приготовление аттестованной смеси (АС) икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрацией 0,1 мг/мл

В виале вместимостью 15 мл (7.3.1) на аналитических весах (7.1.2) взвешивают $(10,0 \pm 0,1)$ мг стандартного образца икариина (7.4.4). Количество метилового спирта V , мл, которое необходимо добавить для приготовления исходного раствора стандартного образца с концентрацией 1 мг/мл, вычисляется по формуле

$$V = \frac{m \times \mu}{c \times 100}, \quad (1)$$

где μ – массовая доля вещества в стандартном образце, %, указанная в паспорте на образец;

m – навеска стандартного образца, мг;

c – массовая концентрация икариина в исходном растворе ($c=1,0$ мг/мл).

Расчетное количество метилового спирта (7.4.1) отбирают дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0 - 5,0) мл (7.1.4). В виалу с навеской добавляют требуемое количество метилового спирта (7.4.1), закрывают крышкой и тщательно перемешивают на орбитальном шейкере (7.2.7) в течение 1 минуты.

Аналогичным способом готовят исходные растворы стандартных образцов икаритина (7.4.5), икаризида I (7.4.6), икаризида II (7.4.7), эпимедина А (7.4.8), эпимедина В (7.4.9) и эпимедина С (7.4.10) в метиловом спирте (7.4.1) с концентрациями 1,0 мг/мл.

В виалу вместимостью 15 мл (7.3.1) дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) вносят по 1,0 мл исходных растворов икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрацией 1,0 мг/мл и 3 мл метанола (7.4.1), закрывают крышкой, тщательно перемешивают и обрабатывают в ультразвуковой ванне (УЗВ) (7.2.27.2.2) в течение 5 мин.

Срок хранения АС в метиловом спирте при температуре $(5,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ – не более 72 часов.

10.3.3 Приготовление градуировочных растворов (ГР) икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте

Из АС икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 1,0 мг/мл путем смешивания и кратного разбавления метиловым спиртом готовят семь ГР, концентрации и алгоритм приготовления которых указаны в таблицах 1 и 2.

ГР готовят в тот же день, что и АС.

Таблица 1 – Концентрации ГР икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте

Приготавливаемый раствор		Раствор АС или ГР, используемый для разведения		Метиловый спирт
№№ ГР	Концентрация компонента, мг/мл	Концентрация компонента, мг/мл	Объем, мл	Объем, мл
1	$5,0 \times 10^{-2}$	0,1	5,0	5,0
2	$2,5 \times 10^{-2}$	0,1	2,5	7,5
3	$1,0 \times 10^{-2}$	0,1	1,0	9,0
4	$5,0 \times 10^{-3}$	0,1	0,5	9,5
5	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	1,0	9,0

Приготавливаемый раствор		Раствор АС или ГР, используемый для разведения		Метиловый спирт
6	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-3}$	1,0	9,0
7	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	1,0	9,0

Таблица 2 – Алгоритм приготовления ГР икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте

№№ ГР	Концентрация ГР, мг/мл	Абсолютная погрешность аттестованного значения ГР, мг/мл	Методика приготовления
АС	0,1	$4,02 \times 10^{-3}$	АС икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С готовятся в соответствии с п. 10.3.2
ГР1	$5,0 \times 10^{-2}$	$2,04 \times 10^{-3}$	Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) отбирают 5,0 мл АС икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С и помещают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) добавляют 5,0 мл метилового спирта (7.4.1). Виалу закрывают крышкой и раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) при 3000 об/мин в течение 2 мин и в течение 5 мин обрабатывают в УЗВ (7.2.2).
ГР2	$2,5 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-3}$	Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) отбирают 2,5 мл АС икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 0,1 мг/мл. и помещают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) добавляют 7,5 мл метилового спирта (7.4.1). Виалу закрывают крышкой и раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) при 3000 об/мин в течение 2 мин и в течение 5 мин обрабатывают в УЗВ (7.2.2)
ГР3	$1,0 \times 10^{-2}$	$4,19 \times 10^{-4}$	Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) отбирают 1,0 мл АС икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 0,1 мг/мл. и помещают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) добавляют 9,0 мл метилового спирта

№№ ГР	Концентрация ГР, мг/мл	Абсолютная погрешность аттестованного значения ГР, мг/мл	Методика приготовления
			(7.4.1). Виалу закрывают крышкой и раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) при 3000 об/мин в течение 2 мин и в течение 5 мин обрабатывают в УЗВ (7.2.2)
ГР4	$5,0 \times 10^{-3}$	$2,17 \times 10^{-4}$	Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) отбирают 0,5 мл АС икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 0,1 мг/мл и помещают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) добавляют 9,5 мл метилового спирта (7.4.1). Виалу закрывают крышкой и раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) при 3000 об/мин в течение 2 мин и в течение 5 мин обрабатывают в УЗВ (7.2.2)
ГР5	$1,0 \times 10^{-3}$	$4,35 \times 10^{-5}$	Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) отбирают 1,0 мл ГР3 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией $1,0 \times 10^{-2}$ мг/мл. и помещают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) добавляют 9,0 мл метилового спирта (7.4.1). Виалу закрывают крышкой и раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) при 3000 об/мин в течение 2 мин и в течение 5 мин обрабатывают в УЗВ (7.2.2)
ГР6	$5,0 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-5}$	Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) отбирают 1,0 мл ГР4 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией $5,0 \times 10^{-3}$ мг/мл. и помещают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) добавляют 9,0 мл метилового спирта (7.4.1). Виалу закрывают крышкой и раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) при 3000 об/мин в течение 2 мин и в течение 5 мин обрабатывают в УЗВ (7.2.2).

№№ ГР	Концентрация ГР, мг/мл	Абсолютная погрешность аттестованного значения ГР, мг/мл	Методика приготовления
ГР7	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,45 \times 10^{-6}$	Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) отбирают 1,0 мл ГР5 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией $1,0 \times 10^{-3}$ мг/мл. и помещают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) добавляют 9,0 мл метилового спирта (7.4.1). Виалу закрывают крышкой и раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) при 3000 об/мин в течение 2 мин и в течение 5 мин обрабатывают в УЗВ (7.2.2)

Срок хранения ГР при температуре $(5,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ – 3 суток.

10.4 Подготовка хроматографической колонки

Хроматографическую колонку устанавливают в термостат хроматографа, подсоединяют к системе и промывают подвижной фазой по приведенной ниже программе. Объемный расход подвижной фазы устанавливают 0,5 мл/мин. Температуру термостата устанавливают $30 ^\circ\text{C}$. Изменение соотношения компонентов подвижной фазы осуществляют ступенчато: 90 % компонента В – промывают систему в течение 30 минут, 50 % компонента В – промывают систему в течение 30 минут и 20 % компонента В – промывают систему в течение 1 часа.

После окончания промывки системы устанавливают рабочие условия 20 % компонента В.

10.5 Условия хроматографического разделения и масс-селективного детектирования

10.5.1 Условия хроматографического разделения

Подвижная фаза – компонент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты

в смеси деионизованная вода/ацетонитрил марки «для ВЭЖХ» (95 % об/5 % об);

– компонент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле марки «для ВЭЖХ».

Режим
хроматографическог
о элюирования

Градиентный

Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы		Скорость потока, мл/мин
	А, %	В, %	
0,0	80	20	0,6
1,0	80	20	0,6
4,0	75	25	0,6
4,5	60	40	0,6
7,5	5	95	0,6
10,5	5	95	0,6
11,0	80	20	0,6

Температура 45 °С

термостата колонки

Объем ввода пробы 0,003 мл

Время анализа 15 мин

10.5.2 Условия работы масс-спектрометрического детектора

Масс-спектрометрический детектор	масс-спектрометр высокого разрешения QExactive с источником ионизации HESI-II
Режим источника ионизации	Ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении
Режим детектирования	Детектирование в режиме мониторинга селективных реакций (SRM) при положительной ионизации (параметры детектирования представлены в таблице 3)
Скорость потока газа-осушителя	5 ед.
Скорость потока вспомогательного газа	10 ед.

Скорость потока газа на распылителе	40 ед.
Напряжение на капилляре	4,0 кВ
Температура на распылителе	280 °С
Температура капилляра	270 °С

Для идентификации икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в биологически активных добавках в таблице 3 приведены основные характеристики регистрируемых соединений.

Таблица 3 – Время удерживания, используемые при регистрации соединений SRM переходы и их относительные интенсивности

№ п/п	Название соединения	Время удерживания, мин	Основной SRM переход (энергия соударительной диссоциации)	Подтверждающий SRM переход	Относительная интенсивность подтверждающего SRM перехода, %
1.	Икариин	4,4	677,2440→313,0707 (40 В)	677,2440→369,1333	25-45
2.	Икаритин	7,0	369,1333→313,0703 (50 В)	369,1333→243,0652	10-20
3.	Икаризид I	5,8	531,1861→313,0703 (40 В)	531,1861→369,1330	50-60
4.	Икаризид II	6,0	515,1912→313,0703 (40 В)	515,1912→369,1330	50-60
5.	Эпимедин А	3,7	839,2968→369,1330 (30 В)	839,2968→313,0703	10-20
6.	Эпимедин В	3,9	809,2863→369,1330 (30 В)	809,2863→313,0703	10-20
7.	Эпимедин С	4,2	823,3019→369,1330 (30 В)	823,3019→313,0703	10-20

10.6 Установление градуировочной характеристики

Для установления градуировочных характеристик градуировочные растворы ГР1-ГР10 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С (таблица 2) дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) отбирают по 0,5 мл ГР1-ГР10 и помещают в виалы вместимостью 2 мл (7.3.2). Виалы плотно закрывают крышками и помещают в автосамплер хроматографа и анализируют по 0,003 мл каждого ГР, начиная с ГР10 (с

меньшей концентрации). Измерения проводят при условиях, указанных в п. 10.5.

Для выполнения параллельного определения из виал снова отбирают по 0,003 мл каждого из ГР и повторно анализируют. Измерения для каждого из ГР выполняют не менее двух раз и с использованием программного обеспечения Xcalibur 2.2 получают зависимость площадей хроматографических пиков икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С от их концентраций в ГР.

Градуировочные характеристики должны быть линейными во всем диапазоне измеряемых концентраций с коэффициентами корреляции не менее 0,99, которые определяются автоматически без вмешательства оператора.

Градуировочные характеристики проверяются ежедневно путем введения любых двух ГР (ГР №№ 1-10) и измерения в них концентрации икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С по градуировочным характеристикам. Отношение разности измеренного и табличного значений к табличному значению содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С для каждого из этих ГР не должно превышать $\pm 10\%$. В случае превышения заданной величины градуировочная характеристика строится заново. Градуировочные характеристики строят заново также после проведения технического обслуживания прибора и смены партий реактивов.

Перед выполнением анализа исследуемого образца необходимо проанализировать «холостую» пробу (пробу растворителя, заведомо не содержащую анализируемых соединений), чтобы удостовериться в отсутствии помех, вызванных загрязнением аналитической системы, посуды и реактивов.

10.7 Контроль аналитической системы

В соответствии с руководством по эксплуатации прибора, в начале каждого рабочего дня масс-спектрометрическую систему проверяют с помощью автоматического теста. Суть теста состоит в том, что в результате настройки необходимо получить масс-спектр калибровочного вещества. Система обработки данных автоматически выполняет тест до тех пор, пока не будут достигнуты все критерии настройки, заложенные в программном обеспечении.

Для оценки пригодности хроматографической системы используется ГРЗ икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C с концентрацией $1,0 \times 10^{-2}$ мг/мл.

Хроматографическая система считается пригодной, если для трех последовательных измерений этого ГР выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение времени удерживания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина A, эпимедина B и эпимедина C не более 5,0 %;
- коэффициент асимметрии пика составляет не более 1,9.

Контроль аналитической системы осуществляется перед работой, а также при смене хроматографической колонки, чистке блоков аналитического прибора и т.д.

Перед измерением хроматографических параметров исследуемого образца необходимо проанализировать «холостую» пробу (измерить хроматографические параметры используемого растворителя – метанола (по п. 10.5)), чтобы удостовериться в отсутствии помех, вызванных загрязнением аналитической системы, посуды и реактивов.

10.8 Отбор проб и подготовка к анализу

Для проведения контроля качества биологически активных добавок отбирают не менее одного блистера (10 капсул) из партии препарата и наносят лабораторную маркировку.

Отобранные пробы допускается хранить в холодильнике (7.2.3) при температуре от 4 до 6 °С не более 7 суток и не более 30 суток при температуре не выше минус 20 °С. При отборе проб составляется Акт отбора.

11 Выполнение измерений

В виалу вместимостью 15,0 мл (7.3.1) вносят содержимое капсулы (флакона) биологически активной добавки. Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0 - 5,0) мл (7.1.4) в виалу вносят по 10,0 мл метанола (7.4.1) и тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) в течение 5 мин. Экстракцию проводят в течение 20 минут, помещая виалы с пробой в УЗВ (7.2.2), после чего центрифугируют в течение 10 минут при 4400 об/мин на центрифуге (7.2.6).

Верхний надосадочный слой виалы отбирают шприцом (7.2.9) 5 мл, отфильтровывают через фильтровальные насадки на шприц (7.2.8) и собирают в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1). Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1 - 1,0) мл (7.1.3) в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1) вносят 0,1 мл отфильтрованного раствора, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0 - 5,0) мл (7.1.4) добавляют 9,9 мл метанола (7.4.1) и тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7) в течение 5 мин.

Полученные растворы анализируют по 0,003 мл при условиях, указанных в п. 10.5.

По значению площади хроматографического пика с использованием градуировочной характеристики и программы обработки данных находят концентрации икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в анализируемом растворе.

При значении площади хроматографического пика анализируемого компонента на хроматограмме исследуемого образца выше верхнего значения диапазона на градуировочной зависимости для данного компонента необходимо разбавление раствора анализируемого образца и повторное

проведение анализа. При вычислении результатов измерений, то есть расчете содержания, необходимо учесть степень разбавления раствора введением в формулу 2 (п. 12.1) коэффициента разбавления k_p .

При значении площади хроматографического пика анализируемого компонента на хроматограмме исследуемого образца ниже нижнего значения диапазона на градуировочной зависимости для данного компонента необходимо увеличение исходной навески образца за счет увеличения числа капсул (флаконов) для одного измерения и повторное проведение анализа.

Для каждого образца биологически активной добавки проводят два измерения.

Вычисление содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в анализируемом образце проводят для каждого из двух параллельных определений по формуле (2). За результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

12 Вычисление результатов измерений

12.1 Вычисление содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в образце биологически активной добавки С, мг в капсуле (флаконе), проводят по формуле

$$C = C_{гр} \times K, \quad (2)$$

где $C_{гр}$ – концентрация контролируемого соединения, найденная по градуировочной характеристике, мг;

K – коэффициент, учитывающий разбавление, равный 1000.

Вычисления проводят для каждого из двух параллельных определений, получая, соответственно, значения C_1 и C_2 .

12.2 За результат измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в

образце биологически активной добавки принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений

$$\bar{C} = \frac{C_1 + C_2}{2}, \quad (3)$$

если выполняется условие приемлемости

$$|C_1 - C_2| \leq r_{\text{abc}}, \quad (4)$$

где C_1 , C_2 – результаты параллельных определений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в образце биологически активной добавки, мг в капсуле (флаконе);

r_{abc} – абсолютное значение предела повторяемости, мг в капсуле (флаконе), рассчитывается по формуле

$$r_{\text{abc}} = 0,01 \times r \times \bar{C}, \quad (5)$$

где \bar{C} – среднее арифметическое значение двух результатов измерений, мг в капсуле (флаконе);

r – относительное значение предела повторяемости, %, приведено в таблице 4.

Если условие (4) не выполняется, проводят два повторных измерения по п. 10.5.

За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие

$$C_{\text{max}} - C_{\text{min}} \leq CR_{0,95}, \quad (6)$$

где C_{max} , C_{min} – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений концентрации икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в образце биологически активной добавки, мг в капсуле (флаконе);

$CR_{0,95}$ – значение критического диапазона для уровня вероятности $P=0,95$.

Таблица 4 – Нормативы контроля измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в образце биологически активной добавки при доверительной вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений, мг в капсуле (флаконе)	Предел повторяемости для двух результатов параллельных определений, r, %	Предел промежуточной прецизионности для двух результатов измерений, R, %	Норматив контроля точности (границы относительной погрешности методики), K (δ), %
0,1 до 50,0 включительно	17	24	17

Значение критического диапазона, $CR_{0,95}$, для четырех результатов рассчитывается по формуле

$$CR_{0,95} = 0,013 \times r \times \bar{c}', \quad (7)$$

где \bar{c}' – среднее арифметическое значение четырех результатов измерений, мг в капсуле (флаконе), рассчитываемое по формуле

$$\bar{c}' = \frac{C_1 + C_2 + C_3 + C_4}{4} \quad (8)$$

Если условие (6) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

13 Контроль качества результатов измерений

Контроль качества результатов измерений при реализации настоящей методики в лаборатории предусматривает:

– контроль повторяемости и промежуточной прецизионности (воспроизводимости) результатов измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в рабочих пробах и в образцах для оценивания (ОО), процедура приготовления которых приведена в приложении А;

– оперативный контроль процедуры анализа (контроль точности результатов измерений);

– контроль стабильности результатов анализа.

13.1 Контроль повторяемости

Контроль повторяемости проводится в соответствии с разделом 5 ГОСТ Р ИСО 5725-6 при каждом анализе рабочей анализируемой пробы или ОО.

13.2 Контроль промежуточной прецизионности

Контроль промежуточной прецизионности проводится по графику и плану контроля качества результатов измерений в лаборатории. Для контроля промежуточной прецизионности используют рабочие пробы образцов биологически активных добавок или ОО.

Отобранные пробы анализируют по прописи настоящей методики измерений в условиях промежуточной прецизионности при соблюдении условий и сроков хранения проб (два аналитика с разными наборами мерной посуды, разными партиями реактивов, в разное время). При контроле промежуточной прецизионности с использованием ОО готовят два параллельных образца, которые анализируют в условиях промежуточной прецизионности.

Получают, соответственно, массовые концентрации \bar{C}_1 и \bar{C}_2 , мг в капсуле (флаконе).

Полученные результаты (\bar{C}_1 , \bar{C}_2) считаются удовлетворительными при условии

$$|\bar{C}_1 - \bar{C}_2| \leq R_{abc}, \quad (9)$$

где R_{abc} – абсолютное значение предела промежуточной прецизионности, мг в капсуле (флаконе), рассчитывается по формуле

$$R_{abc} = 0,01 \times R \times \bar{C}, \quad (10)$$

где R – относительное значение предела промежуточной прецизионности, %, приведенное в таблице 4;

\bar{C} – среднее арифметическое значение результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, мг в капсуле (флаконе), рассчитывается по формуле

$$\bar{C} = \frac{\bar{C}_1 + \bar{C}_2}{2} \quad (11)$$

Если условие (9) не выполняется, выясняют причины превышения норматива промежуточной прецизионности, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

13.3 Оперативный контроль процедуры анализа (контроль точности)

Оперативный контроль процедуры анализа осуществляют на основе оценки точности (погрешности) результатов анализа при реализации отдельно взятой контрольной процедуры с использованием ОО с учетом требований ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002.

При проведении оперативного контроля рассчитывают результат контрольной процедуры, норматив контроля точности и проводят сравнение результата контрольной процедуры с установленным нормативом контроля точности.

Результат контроля считают удовлетворительным, если выполняется условие

$$| C_{amm} - \bar{C} | \leq K_{abc}, \quad (12)$$

где K_{abc} – абсолютное значение норматива контроля точности (погрешности), мг в капсуле (в флаконе), рассчитывается по формуле

$$K_{abc} = 0,01 \times K \times C_{amm}, \quad (13)$$

где C_{amm} – опорное значение содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в ОО, мг в капсуле (в флаконе);

\bar{C} – результат анализа ОО (среднее арифметическое результатов двух параллельных определений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в ОО), мг в капсуле (флаконе);

К – норматив контроля точности (погрешности), %.

Если условие (12) не выполняется, выясняют причины превышения норматива контроля точности, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

Периодичность оперативного контроля процедуры анализа регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Проведение оперативного контроля является обязательным при смене партии реактивов, набора мерной посуды, хроматографической кварцевой капиллярной колонки, а также после промывки детектора, поверки хроматографа и ремонта используемого оборудования.

В таблице 5 приведены значения показателей качества методики, которые используются при установлении показателей качества результатов измерений при реализации методики измерений в лаборатории и контроле стабильности результатов измерений (среднеквадратического отклонения повторяемости $\sigma_{гп}$, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности $\sigma_{Rл}$ и погрешности результатов измерений $\pm\Delta_{л}$).

Таблица 5 – Значения показателей точности, правильности, повторяемости и промежуточной прецизионности методики при доверительной вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений, мг в капсуле (флаконе)	Показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторяемости) $\sigma_{гп}$, %	Показатель промежуточной прецизионности (среднее квадратическое отклонение промежуточной прецизионности) $\sigma_{Rл}$, %	Показатель правильности (границы, в которых находится неисключенная систематическая погрешность методики), $\pm\Delta_{с}$, %
0,1 до 50,0 включительно	6	9	6

13.4 Контроль стабильности результатов измерений

Контроль стабильности результатов измерений при реализации методики в лаборатории осуществляют в соответствии с разделом 6 ГОСТ Р ИСО 5725 и разделами 6-8 РМГ 76-2004.

Процедуры и периодичность контроля стабильности результатов анализа (на основе контроля стабильности СКО повторяемости $\sigma_{гп}$, СКО внутрилабораторной прецизионности $\sigma_{рл}$ и/или погрешности $\pm\Delta_{л}$) регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

14 Оформление результатов измерений

Результаты измерений содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С представляют в виде:

С (мг в капсуле (флаконе)), характеристика погрешности δ (%), $P = 0,95$
или $(\bar{C} \pm \Delta)$, мг в капсуле (флаконе), $P=0,95$,

где \bar{C} – среднее арифметическое результатов n определений, признанных приемлемыми по 12.2, мг в капсуле (флаконе);

Δ – абсолютная погрешность определения содержания анализируемого вещества, мг в капсуле (флаконе).

Значение Δ , мг в капсуле (флаконе), рассчитывают по формуле

$$\Delta = \delta \times \bar{C} \times 0,01, \quad (14)$$

где δ – границы относительной погрешности определения содержания икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С, $\delta = \pm 17 \%$.

Числовые значения массовой доли и погрешности должны оканчиваться цифрой одного и того же разряда.

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа оформляют записью в рабочем журнале по форме, принятой на предприятии, использующем данную методику измерений.

Результаты измерений оформляют протоколом КХА, рекомендуемая форма которого приведена в приложении Б.

Результаты измерений удостоверяются лицом, проводившим измерения, утверждаются начальником лаборатории, а при необходимости – руководителем (главным метрологом) организации, подпись которых заверяется печатью организации (предприятия).

*Приложение (обязательное)**Процедура приготовления образцов для оценивания*

Образцы для оценивания предназначены для набора статистических данных, необходимых для установления метрологических характеристик методики измерений и для проведения контроля качества измерений.

Образцами для оценивания являются сухие биологически активные добавки с внесенной в них добавкой аттестованного раствора с аттестованным значением определяемого компонента.

А.1 Приготовление аттестованных растворов (АР)

А.1.1 Приготовление промежуточных растворов (ПР) икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрациями 100,0 мг/мл.

В виале вместимостью 15 мл (7.3.1) на весах лабораторных электронных (7.1.2) взвешивают $(100,0 \pm 0,1)$ мг лабораторного образца икариина (7.4.4).

Количество метилового спирта V , мл, которое необходимо добавить для приготовления ПР, вычисляется по формуле

$$V = \frac{m \times \mu}{c \times 100} \quad (\text{А.1})$$

где μ – массовая доля икариина в лабораторном образце, %, указанная в паспорте (7.4.4);

m – масса навески икариина, мг;

c – концентрация икариина в ПР, $c = 100,0$ мг/мл.

Расчетное количество метилового спирта (7.4.1) отбирают дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) и вносят в виалу с навеской. Полученный раствор тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7).

Приготовленный раствор обрабатывают в ультразвуковой ванне (7.2.2) в течение 5 минут.

Аналогичным образом готовят ПР для икаритина (7.4.5), икаризида I (7.4.6), икаризида II (7.4.7), эпимедина А (7.4.8), эпимедина В (7.4.9) и эпимедина С (7.4.10).

После приготовления ПР на виалы наклеивают этикетки с наименованием растворов, их концентраций и датой приготовления.

Срок хранения ПР икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте при температуре $(4,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ – не более 7 сут.

Относительная погрешность приготовления ПР не превышает 0,86 %.

А.1.2 Приготовление АР № 1 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрацией 10,0 мг/мл.

Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) отбирают по 1,0 мл каждого из ПР икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 100,0 мг/мл и вносят в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1), затем дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл (7.1.4) вносят 3,0 мл метилового спирта (7.4.1) и тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7).

Срок хранения АР в холодильнике (7.2.3) при температуре $(4,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ – не более 72 ч.

АР соединений с массовой концентрацией 10,0 мг/мл используют для приготовления образцов для оценивания. Относительная погрешность аттестованного значения массовой концентрации АР не превышает 3,04 %.

А.1.3 Приготовление АР № 2 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрацией 1,0 мг/мл

Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1) вносят 1,0 мл АР № 1 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрацией 10,0 мг/мл и 9,0 мл

метилового спирта (7.4.1) и тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7).

Срок хранения АР в холодильнике (7.2.3) при температуре $(4,0 \pm 1,0)$ °С – не более 72 ч.

АР № 2 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с массовой концентрацией 1,0 мг/мл используют для приготовления образцов для оценивания. Относительная погрешность аттестованного значения массовой концентрации АР не превышает 3,25 %.

А.1.4 Приготовление АР № 3 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрацией 0,1 мг/мл

Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) в виалу вместимостью 15 мл (7.3.1) вносят 1,0 мл АР № 2 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в метиловом спирте с концентрацией 1,0 мг/мл и 9,0 мл метилового спирта (7.4.1) и тщательно перемешивают с использованием орбитального шейкера (7.2.7).

Срок хранения АР в холодильнике (7.2.3) при температуре $(4,0 \pm 1,0)$ °С – не более 72 ч.

АР № 3 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с массовой концентрацией 0,1 мг/мл используют для приготовления образцов для оценивания. Относительная погрешность аттестованного значения массовой концентрации АР не превышает 3,46 %.

А.2 Приготовление образцов для оценивания (ОО)

А.2.1 Приготовление ОО с содержанием икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С 50 мг в капсуле (флаконе) (ОО № 1)

В виале вместимостью 15 мл (7.3.1) навесах лабораторных (7.1.2) взвешивают $(46,0 \pm 0,2)$ мг сухой биологически активной добавки, не содержащей икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С.

Дозаторами механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) вносят 0,5 мл АР № 1 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 10,0 мг/мл. После внесения АР № 1 виалу с образцом для оценивания выдерживаются в токе азота под упаривателем-концентратором (7.2.10) для удаления растворителя в течение 30 мин, а затем при комнатной температуре в течение 40 мин.

Содержание икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в ОО (опорное значение), С, (мг в капсуле (флаконе)), рассчитывают по формуле

$$C = \frac{C_{AP} \times V_{AP} \times m_{ck}}{m_n} \quad (A.2)$$

где C_{AP} – массовая концентрация икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в АР, мг/мл;

V_{AP} – объем АР икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С, используемый для приготовления ОО, мл;

m_{ck} – масса содержимого капсулы с биологически активной добавкой, мг, $m_{ck} = 460,0$ мг;

m_n – масса навески используемая для приготовления образца для оценивания, мг, $m_n = 46,0$ мг.

Расчётное содержание (опорное значение) икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в ОО №1 составляет 50 мг.

Абсолютную погрешность аттестованного значения ОО рассчитывают по формуле

$$\Delta C_{OO} = 0,01 * C_{OO} * \delta_{OO} \quad (A.3)$$

где C_{OO} – содержание икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в ОО,

δ_{OO} – относительную погрешность приготовления ОО; рассчитывают по формуле

$$\delta_{OO} = \sqrt{(\delta_{AP})^2 + (\delta_{доз})^2 + (\Delta_{вес} \times 100 / m_n)^2}, \quad (A.4)$$

где δ_{AP} – относительная погрешность приготовления аттестованного раствора;

$\delta_{доз}$ – относительная погрешность дозатора;

$\Delta_{вес}$ – абсолютная погрешность взвешивания;

m – масса навески в мг.

В соответствии с формулой (A.4) абсолютная погрешность приготовления ОО №1 составляет

$$\delta_{OO1} = \sqrt{(3,04)^2 + (1,38)^2 + (0,43)^2} = 3,34 \%$$

В соответствии с формулой (A.3) абсолютная погрешность аттестованного значения ОО №1 составляет

$$\Delta C_{OO1} = 0,01 \times 3,34 \times 50 = 1,67 \text{ мг};$$

A.2.2 Приготовление ОО с содержанием икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С 1,0 мг в капсуле (флаконе) (ОО №2)

В виале вместимостью 15 мл (7.3.1) навесах лабораторных (7.1.2) взвешивают $(46,0 \pm 0,2)$ мг сухой биологически активной добавки, не содержащей икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С.

Дозаторами механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) вносят 0,1 мл АР № 2 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 1,0 мг/мл. После внесения АР № 2 виалу с образцом для оценивания выдерживаются в токе азота под упаривателем-концентратором (7.2.10) для удаления растворителя в течение 30 мин, а затем при комнатной температуре в течение 40 мин.

Расчётное содержание (опорное значение) икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в ОО №2, С₂, составляет 1,0 мг.

Абсолютная и относительная погрешности аттестованного значения ОО №2, в соответствии с формулами (А.3 – А.4), составляют

$$\delta_{\text{ОО2}} = 3,85\%$$

$$\Delta C_{\text{ОО2}} = 0,04 \text{ мг};$$

А.2.3 Приготовление ОО с содержанием икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С 0,1 мг в капсуле (флаконе) (ОО №3)

В виале вместимостью 15 мл (7.3.1) навесах лабораторных (7.1.2) взвешивают (46,0±0,2) мг сухой биологически активной добавки, не содержащей икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С.

Дозаторами механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл (7.1.3) вносят 0,1 мл АР № 3 икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С с концентрацией 0,1 мг/мл. После внесения АР № 3 виалу с образцом для оценивания выдерживаются в токе азота под упаривателем-концентратором (7.2.10) для удаления растворителя в течение 30 мин, а затем при комнатной температуре в течение 40 мин.

Расчётное содержание (опорное значение) икариина, икаритина, икаризида I, икаризида II, эпимедина А, эпимедина В и эпимедина С в ОО №3, С₃, составляет 0,1 мг.

Абсолютная и относительная погрешности аттестованного значения ОО №3, в соответствии с формулами (А.3, А.4), составляют

$$\delta_{\text{ОО3}} = 4,02 \%$$

$$\Delta C_{\text{ОО3}} = 0,004 \text{ мг};$$

Анализ полученных образцов проводится непосредственно после приготовления в соответствии с прописью методики измерений.